

Aus der Klinik für Allgemeine Dermatologie und Allergologie der  
Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Happle  
in Zusammenarbeit mit dem  
Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg  
Abt. Klinische Kooperationseinheit für Dermato-Onkologie  
am Universitätsklinikum Mannheim  
Leiter: Prof. Dr. D. Schadendorf

---

**Präklinische Untersuchungen zur  
Gentherapie des malignen Melanoms:  
Entwicklung von Plasmiden zur selektiven  
Expression von "Suizidgenen" in Melanomzellen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von

**Heike Rothfels**  
aus Waiblingen

Marburg/Lahn 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 15.02.2002  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold  
Referent: Prof. Dr. R. Happle  
Korreferent: Prof. Dr. D. Schadendorf

---

# INHALTSVERZEICHNIS

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Die Genterapie als alternative Tumorthherapie.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Die Immunstimulation .....   | 2         |
| 1.1.2      | Die Reparatur der gestörten Zellteilung.....   | 2         |
| 1.1.3      | Die "Suizidgentherapie" .....  | 2         |
| <b>1.2</b> | <b>Wirkungsweise der "Suizidgene" .....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.2.1      | Das Diphtherietoxin.....   | 6         |
| 1.2.2      | Die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase .....  | 7         |
| <b>1.3</b> | <b>Zelltypspezifische "Suizidgen"-Expression durch gewebespezifische Promotoren und Enhancer .....</b> | <b>9</b>  |
| 1.3.1      | Der Tyrosinasepromotor .....   | 10        |
| 1.3.1.1    | Enhancer des humanen Tyrosinasepromotors.....  | 12        |
| 1.3.1.2    | Enhancer des murinen Tyrosinasepromotors.....  | 12        |
| 1.3.2      | Der MIA-Promotor.....  | 12        |
| 1.3.3      | Der Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasepromotor.....   | 14        |
| <b>1.4</b> | <b>Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>A</b>   | <b>Material.....</b>   | <b>16</b> |
|            | Chemikalien und Reagenzien .....   | 16        |
|            | Geräte .....   | 17        |
|            | Verbrauchsmaterialien .....  | 18        |
|            | Kits .....   | 19        |
|            | Enzyme .....   | 19        |
|            | Zelllinien .....   | 19        |
|            | Bakterienstamm.....  | 19        |
|            | Plasmide .....   | 20        |
|            | Primer .....   | 20        |
| <b>B</b>   | <b>Methoden .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Methoden der Zellkultur:.....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1      | Kultivierung von Zellen.....   | 22        |
| 2.1.2      | Passagieren von Zellen.....  | 22        |
| 2.1.3      | Einfrieren und Auftauen von Zellen .....   | 23        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.1.4      | Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Kammer .....   | 23        |
| 2.1.5      | Transiente Transfektion .....   | 24        |
| 2.1.6      | MTT-Test .....  | 24        |
| <b>2.2</b> | <b>Immunologische Methoden: .....</b>   | <b>25</b> |
| 2.2.1      | Detektion GFP-exprimierender Zellen mittels FACScan .....   | 25        |
| 2.2.2      | CAT-ELISA .....   | 26        |
| 2.2.3      | $\beta$ -Galaktosidase-Test .....   | 27        |
| <b>2.3</b> | <b>Mikrobiologische Methoden: .....</b>   | <b>28</b> |
| 2.3.1      | Anzucht und Stammhaltung von Bakterien .....  | 28        |
| 2.3.2      | Herstellung "kompetenter" Bakterien .....   | 28        |
| <b>2.4</b> | <b>Molekularbiologische Methoden: .....</b>   | <b>29</b> |
|            | Arbeiten mit DNA: .....   | 29        |
| 2.4.1      | Präparation von Plasmid-DNA (aus E.coli) für analytische Zwecke ("Mini-Prep") .....               | 29        |
| 2.4.2      | Präparative Isolierung von Plasmid-DNA .....  | 29        |
| 2.4.3      | Standardbedingungen zur Fällung von Nukleinsäuren .....   | 30        |
| 2.4.4      | Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren .....                                    | 30        |
| 2.4.5      | Spaltung mit Restriktionsenzymen .....  | 30        |
| 2.4.6      | DNA-Gelelektrophorese .....   | 31        |
| 2.4.7      | Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid .....  | 31        |
| 2.4.8      | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels "QIAquick Gel Extraction Kit" .....       | 32        |
| 2.4.9      | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels mehrmaligem Einfrieren und Auftauen ..... | 32        |
| 2.4.10     | Subklonierung von DNA-Fragmenten .....  | 32        |
| 2.4.10.1   | Dephosphorylierung des Vektors .....  | 32        |
| 2.4.10.2   | Auffüllen 5'-überhängender Enden und Abbau 3'-überhängender Enden .....                           | 33        |
| 2.4.10.3   | Ligationsreaktion .....   | 34        |
| 2.4.10.4   | Transformation .....  | 34        |
| 2.4.10.5   | Selektion positiver Transformanten .....  | 35        |
| 2.4.11     | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....   | 35        |
| 2.4.12     | PCR-"Mini-Prep" .....   | 36        |
| 2.4.13     | Abtrennung freier Nukleotide .....  | 37        |
|            | Arbeiten mit RNA: .....   | 37        |
| 2.4.14     | Präparation von Gesamt-RNA aus Zelllinien .....   | 37        |
| 2.4.15     | RNA-Aufarbeitung (DNase-Behandlung) .....   | 38        |
| 2.4.16     | Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren .....  | 38        |
| 2.4.17     | Konzentrationsbestimmungen von RNA .....  | 39        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.4.18     | RNA-Gelelektrophorese .....   | 39        |
| 2.4.19     | Northern Blot.....  | 40        |
| 2.4.19.1   | Northern Transfer.....  | 40        |
| 2.4.19.2   | Radioaktive Markierung von Sonden.....  | 41        |
| 2.4.19.3   | Hybridsierung und autoradiographische Detektion .....   | 42        |
| 2.4.19.4   | Entfernung der Sonde ("Stripping") .....  | 43        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Untersuchung der Spezifität des Tyrosinase- und des MIA-Promotors ....</b>   | <b>45</b> |
| 3.1.1      | Überprüfung der endogenen Tyrosinase- und MIA-Expression in<br>verschiedenen Melanomzelllinien und HeLa mittels Northern Blot .....   | 45        |
| 3.1.2      | Untersuchung der Aktivität und Spezifität der genregulatorischen<br>Sequenzen des Tyrosinase- und MIA-Gens sowie des HSVtk-Gens ..... | 46        |
| 3.1.2.1    | Herstellung der Promotorkonstrukte.....   | 47        |
| 3.1.2.2    | Untersuchung der Aktivität und Spezifität des Tyrosinase-, MIA- und<br>HSVtk-Promotors im Vergleich zum CMV-Promotor.....             | 48        |
| <b>3.2</b> | <b>Steigerung der Promotoraktivität durch Enhancerelemente.....</b>   | <b>50</b> |
| 3.2.1      | Steigerung der Promotoraktivität durch murine Tyrosinase-Enhancer.....  | 50        |
| 3.2.1.1    | Herstellung der Enhancerkonstrukte .....  | 50        |
| 3.2.1.2    | Untersuchung des Einflusses der Enhancer auf Promotoraktivität und -<br>spezifität .....  | 52        |
| 3.2.2      | TDE-Enhancer bewirken keine weitere Steigerung der Promotoraktivität<br>der MIA/HSVtk-Promotorkonstrukte .....                        | 56        |
| 3.2.2.1    | Herstellung der TDE-Konstrukte .....  | 56        |
| 3.2.2.2    | Untersuchung der Promotoraktivität der TDE-Konstrukte.....  | 57        |
| <b>3.3</b> | <b>Spezifische Abtötung von Melanomzellen durch zelltypspezifische<br/>Expression von "Suizidgenen" .....</b>                         | <b>58</b> |
| 3.3.1      | Wirkung der A-Kette des Diphtherietoxins als "Suizidgen" .....  | 59        |
| 3.3.1.1    | Herstellung der DT-A-Expressionsplasmide.....   | 59        |
| 3.3.1.2    | Untersuchung der Wirksamkeit der DT-A-Expressionsplasmide .....   | 61        |
| 3.3.2      | Wirkung der Herpes-Simplx-Virus-Thymidinkinase als "Suizidgen" .....  | 64        |
| 3.3.2.1    | Herstellung der TK-Expressionsplasmide .....  | 64        |
| 3.3.2.2    | Untersuchung der Wirksamkeit der TK-Expressionsplasmide .....   | 66        |
| 3.3.3      | Bestimmung der Transfektionseffizienz.....  | 69        |
| 3.3.4      | Vergleich der Wirksamkeit von DT-A und TK als "Suizidgen" im zeitlichen<br>Verlauf .....  | 70        |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>73</b>  |
| 4.1      | Endogene Tyrosinase- und MIA-Expression ist in verschiedenen Melanomzelllinien, nicht aber in HeLa nachweisbar .....                 | 75         |
| 4.2      | Die melanomzellspezifische Aktivität der untersuchten Promotoren kann durch murine Tyrosinase-Enhancerelemente stark erhöht werden . | 76         |
| 4.2.1    | Die Aktivitätssteigerung des Tyrosinasepromotors durch Enhancer .....  | 76         |
| 4.2.2    | Die murinen Enhancerelemente steigern auch die Aktivität des MIA-Promotors melanomzellspezifisch .....                               | 78         |
| 4.2.3    | Der unspezifische HSVtk-Promotor wird durch die Enhancer melanomzellspezifisch aktiviert .....                                       | 78         |
| 4.2.4    | Die TDE-Enhancer führen zu keiner zusätzlichen Steigerung der Promotoraktivität .....  | 79         |
| 4.3      | Vergleich der Effizienz der DT-A- und TK-Expressionsplasmide.....  | 80         |
| 4.3.1    | Die TK-Expressionsplasmide sind effizienter in der Abtötung der Melanomzellen als die DT-A-Expressionsplasmide.....                  | 80         |
| 4.3.1.1  | Die Rolle der Transfektionseffizienz und des "Bystander-Effekts" .....   | 81         |
| 4.3.2    | Nur die HSVtk-Expressionsplasmide können die Zellzahl nachhaltig reduzieren.....   | 84         |
| 4.3.3    | Tyrosinase- und MIA-Promotorplasmide töten die Melanomzellen mit ähnlicher Effizienz wie die CMV-Promotorplasmide .....              | 85         |
| 4.4      | Schlußfolgerung .....  | 85         |
| 4.5      | Ausblick .....   | 86         |
| <b>5</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>88</b>  |
| <b>6</b> | <b>ABKÜRZUNGEN .....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>7</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>8</b> | <b>ANHANG.....</b>   | <b>101</b> |
| 8.1      | Akademische Lehrer .....   | 101        |
| 8.2      | Danksagung.....  | 102        |

# **1 EINLEITUNG**

Das Melanom ist ein Tumor der Pigmentzellen der Haut, dessen Inzidenz und Mortalität weltweit ansteigt. Nach eingetretener Metastasierung erweisen sich die klassischen Behandlungsmöglichkeiten wie Chemotherapie und Bestrahlung als wenig effizient, was zu einer schlechten Prognose führt (Ahmann et al., 1989; zur Übersicht: Bergmann, 1989; Johnson et al., 1995). Zur Zeit werden für die Behandlung des metastasierten Melanoms verschiedene chemotherapeutische Protokolle, auch in Kombination mit Zytokinen, oder vereinzelt auch reine Zytokintherapie-Protokolle eingesetzt (zur Übersicht: Franke et al., 2001; Kamanabrou, 2001). Die Ansprechraten derartiger Therapien liegen unter 30%. Komplette Remissionen sind äußerst selten. Aus diesem Grund besteht ein enormer Bedarf an neuen, effektiveren Therapieansätzen für eine gezielte Behandlung dieses extrem aggressiven Tumors der Haut. Ein vielversprechender experimenteller Therapieansatz für die Behandlung des malignen Melanoms ist die Gentherapie.

## **1.1 Die Gentherapie als alternative Tumorthherapie**

Als Gentherapie wird das Einschleusen genetischer Information in Zellen zu therapeutischen Zwecken bezeichnet. Zunächst zielte die Anwendung der Gentherapie darauf, Gendefekte bei Erbkrankheiten zu korrigieren. In der Zwischenzeit spielen jedoch Krebserkrankungen die weit größere Rolle beim Einsatz der Gentherapie in klinischen Studien.

1991 wurde der erste Gentransfer zur Tumorthherapie innerhalb einer klinischen Studie angewandt. Rosenberg und Kollegen behandelten Melanompatienten mit genetisch veränderten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL), die große Mengen Tumor-Nekrosefaktor (TNF) sezernierten (Antoine, 1990; Gershon, 1991). Seither wurden über 250 klinische Studien an verschiedensten Tumoren durchgeführt. Dabei werden unterschiedliche Strategien zur Bekämpfung der Tumorzellen eingesetzt (zur Übersicht: Rochlitz, 2001): die Immunstimulation, die Reparatur der gestörten Zellteilung und die "Suizidgentherapie".

### **1.1.1 Die Immunstimulation**

2/3 aller Gentherapie-Studien in der Onkologie haben die Stimulation des Immunsystems zum Ziel. Dabei soll entweder die Effektivität von Immunzellen oder die Immunogenität der Tumorzellen gesteigert werden. Das Ziel ist also, die Tumorzellen mit Hilfe des eigenen Immunsystems zu zerstören. Um die Effektivität von Immunzellen zu steigern, werden z.B. Gene für Zytokine, Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle oder chimäre Antikörper/T-Zell-Rezeptor-Moleküle in verschiedene Effektorzellen des Immunsystems eingebracht (Anderson, 1998; zur Übersicht: Roth & Cristiano, 1997). Vielversprechender scheinen jedoch Ansätze, bei denen die Immunogenität der Tumorzellen durch Einbringen von Zytokingenen wie z.B. den Genen für Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-7, Interleukin-12, Interferon  $\gamma$  oder Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  oder durch Gene für kostimulierende Moleküle wie B7-1 und B7-2 verstärkt wird.

### **1.1.2 Die Reparatur der gestörten Zellteilung**

Eine andere Strategie der Gentherapie ist die Reparatur der gestörten Zellteilung von Tumorzellen. Das Ziel hierbei ist die Inaktivierung von Onkogenen (z.B. ras, c-myc, c-erbB-2, abl und bcl-2) bzw. die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. rb, p16 oder p53) in der Tumorzelle. Der Gentransfer von Wildtyp-p53 in Lungentumoren führte beispielsweise in einem Teil der behandelten Patienten zum Stopp des Tumorwachstums oder sogar zur Regression des Tumors, möglicherweise durch Induktion von Apoptose (Roth et al., 1996).

### **1.1.3 Die "Suizidgentherapie"**

Neben den gentherapeutischen Ansätzen der Immunstimulation und der Reparatur des Zellzyklus wird die "Suizidgentherapie" als dritte Strategie in der Tumorgentherapie verfolgt. Das Prinzip der "Suizidgentherapie" basiert auf der Expression eines direkt oder indirekt toxischen Genprodukts in der Tumorzelle. Direkt toxische Genprodukte sind z.B. bakterielle Toxine wie z.B. das Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* oder das *Pseudomonas*



Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa* (zur Übersicht: Falnes & Sandvig, 2000; Fitzgerald, 1996), die die Translation der Zielzelle hemmen und sie dadurch abtöten (siehe auch Abb. 1.1A). Indirekt toxische Genprodukte sind sogenannte "Prodrug"-aktivierende Enzyme meist bakteriellen oder viralen Ursprungs, die ein zunächst ungiftiges Medikament ("Prodrug") in für die Zelle toxische Produkte umsetzen. Erst die Wirkung des umgesetzten Medikaments führt zum Tod der Zelle (siehe auch Abb. 1.1B). Zu diesen in der "Suizidgentherapie" am häufigsten verwendeten "Prodrug"-aktivierenden Enzymen gehören die Purin-Nukleotid-Phosphorylase aus *Escherichia coli*, die Cytosindeaminase aus Pilzen und Bakterien sowie die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (zur Übersicht: Greco & Dachs, 2001; Springer & Niculescu Duvaz, 2000). Eine Übersicht über Toxine und "Prodrug"-aktivierende Enzyme in der "Suizidgentherapie" gibt Tabelle 1.1.

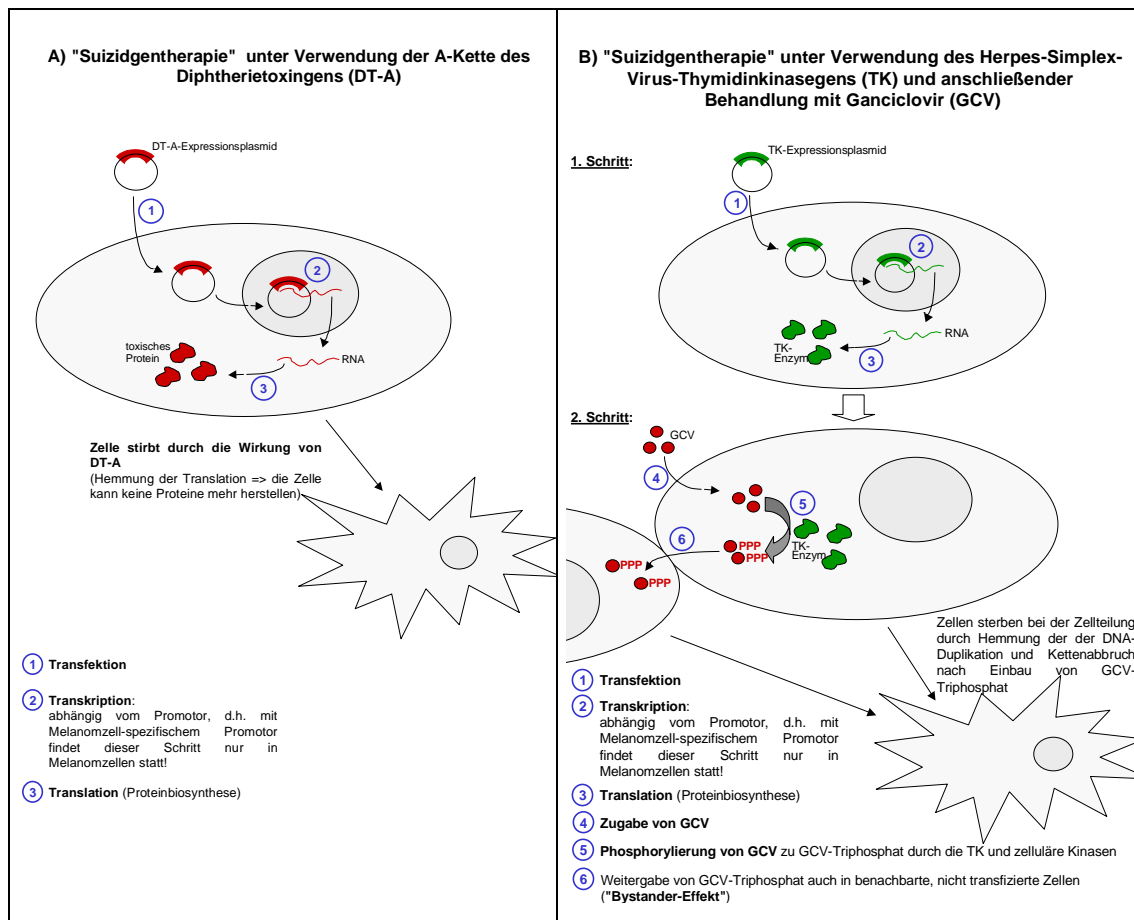
In dieser Arbeit wurden das Diphtherietoxigen und das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasegen als "Suizidgene" verwendet, da sie verschiedene Wirkmechanismen vertreten. In der Gruppe der direkt toxischen "Suizidgene" ist das Diphtherietoxigen das am häufigsten verwendete und der Wirkmechanismus des Proteins ist gut untersucht. Dies gilt auch für das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasegen aus der Gruppe der "Suizidgene" für

| <b><u>A: direkt toxische "Suizidgen"-Produkte (Toxine)</u></b> |                                    |   |
|--|------------------------------------|---|
| <b>Toxin</b>   | <b>Herkunft</b>                    | <b>Wirkungsweise</b>  |
| Diphtherietoxin  | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors EF-2 führt zur Inhibition der Proteinsynthese der Zelle                          |
| <i>Pseudomonas</i> Exotoxin                                    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | "   |
| Shigatoxin   | <i>Shigella dysenteriae</i>        | Abspaltung eines Adenosins von der 28S rRNA in der 60S-Untereinheit des Ribosoms führt zur Inhibition der Proteinsynthese |
| Ricin*   | <i>Ricinus communis</i>            | "   |

| <b><u>B: "Prodrug"-aktivierende Enzyme</u></b>                    |  |   |
|---|--|---|
| <b>Enzym</b>  | <b>"Prodrug"</b>   | <b>Wirkungsweise</b>  |
| Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase                               | Ganciclovir (GCV)  | GCV wird zu GCV-Triphosphat umgesetzt, dieses hemmt die DNA-Synthese  |
| Cytosindeaminase ( <i>E. coli</i> )                               | 5-Fluorocytosin (5-FC)   | 5-FC wird zu 5-Fluorouracil (5-FU) und dann zu weiteren Metaboliten umgesetzt, diese inhibieren die Thymidylat-Synthase und führen zu 5-FU-RNA- und 5-FU-DNA-Komplexen (Inhibition der RNA- und DNA-Synthese) |
| Purin-Nukleosid-Phosphorylase** ( <i>E. coli</i> )                | 6-Methylpurin-2'-Deoxyribonukleosid (6-MPDR)                             | 6-MPDR wird zu 6-Methylpurin umgesetzt, dieses inhibiert die Protein-, DNA- und RNA-Synthese  |
| Nitroreduktase ( <i>E. coli</i> )                                 | 5-(Aziridin-1-yl)-2,4-Dinitrobenzamid (CB1954)                           | CB1954 wird zu einem Alkylator umgesetzt, der nach weiterer Umsetzung DNA-Crosslinks verursacht   |
| Carboxypeptidase G2 (bakteriell)                                  | 4-((2-Chloroethyl)(2-mesyloxyethyl) Amino)Benzoyl-L-Glutaminsäure (CMDA) | von CMDA wird der Glutaminsäurerest abgespalten, führt zu DNA-Crosslinks  |
| Cytochrom P450 (Ratte)  | Cyclophosphamide (CP)  | CP wird hydroxyliert, führt zu DNA-Crosslinks, G <sub>2</sub> -M-Arrest und Apoptose  |
| Methionin $\alpha,\gamma$ -lyase*** ( <i>Pseudomonas putida</i> ) | Selenomethionin (SeMET)  | SeMET wird u.a. zu Methylselenol umgesetzt, dies schädigt die Mitochondrien und führt zur Apoptose  |
| Meerrettich Peroxidase  | Indol-3-Essigsäure (IAA)   | aktivierte Substanz noch nicht identifiziert; entstehende Radikale reagieren vermutlich mit DNA und anderen zellulären Bestandteilen  |

**Tab. 1.1: Toxine und "Prodrug"-aktivierende Enzyme in der "Suizidgentherapie"** mit ihren Wirkmechanismen. A: direkt toxisch wirkende "Suizidgen"-Produkte (\*Endo et al., 1987; zur Übersicht: Middlebrook & Dorland, 1984; Schmitt et al., 1999). B: "Prodrug"-aktivierende Enzyme (Greco & Dachs, 2001 (Übersicht); \*\*\*Miki et al., 2001; \*\*Parker et al., 1997; Springer & Niculescu Duvaz, 2000 (Übersicht)).

"Prodrug"-aktivierende Enzyme. Zudem ist das Substrat der Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase, Ganciclovir, ein zugelassenes Medikament und damit sowohl gut verfügbar als auch pharmakologisch im menschlichen Organismus intensiv getestet. Die Wirkungsweise des Diphtherietoxins und der Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase wird im folgenden näher erläutert (siehe auch Abb. 1.1).



**Abb.1.1: Prinzipien der "Suizidgentherapie".** Schematisch dargestellt ist der Unterschied zwischen (A) der direkt toxischen Wirkung der A-Kette des Diphtherietoxins (DT-A) und (B) der erst im zweiten Schritt toxischen Wirkung nach Gabe von Ganciclovir (GCV) bei Verwendung des "Prodrug"-aktivierenden Enzyms Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (TK).

## 1.2 Wirkungsweise der "Suizidgene"

Sowohl das Diphtherietoxin als auch das "Prodrug"-aktivierende Enzym Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase, deren kodierende Sequenzen in der "Suizidgentherapie" eingesetzt werden, haben aufgrund ihrer Eigenschaften als Enzyme die Gemeinsamkeit, daß wenige Moleküle pro Zelle große Wirkung

entfalten können. Deshalb sind sie potente Moleküle zur Abtötung von Zellen. Die Wirkungsweise dieser beiden "Suizidgene" unterscheidet sich jedoch deutlich (siehe auch Abb. 1.1).

### 1.2.1 Das Diphtherietoxin

Das Diphtherietoxin stammt aus *Corynebacterium diphtheriae*, einem gram-positiven Bakterium, und besteht aus einer A- und einer B-Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Greenfield et al., 1983; Übersicht: Pappenheimer, 1977). Die A-Kette enthält die katalytische C-Domäne, die B-Kette eine Transmembran- (T-) und eine Rezeptorbindungs- (R-) Domäne (Choe et al., 1992). Die B-Kette ist wichtig für das Eindringen des Toxins in eukaryontische Zellen: mit der R-Domäne bindet es an das Vorläufermolekül eines Heparin-bindenden "EGF-Like Growth Faktor" (HB-EGF) auf der Zelloberfläche (Naglich et al., 1992) und wird anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (Simpson et al., 1998). Die A-Kette trägt mit der C-Domäne die komplette enzymatische Aktivität des Toxins.

Die A-Kette des Diphtherietoxins (DT-A) entfaltet ihre toxische Wirkung durch Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2), eines essentiellen Faktors bei der Proteinbiosynthese in allen eukaryontischen Zellen. EF-2 wird durch Anhängen einer ADP-Ribosylgruppe gehemmt, was zur Unterbrechung der Proteinbiosynthese führt (Collier, 1975 (Übersicht); Kohno et al., 1986; Moehring et al., 1984; Pappenheimer, 1977 (Übersicht)) und den Tod der Zelle zur Folge hat.

DT-A ist ein hochwirksames Toxin, denn ein einziges Molekül genügt, um eine Zelle zu töten (Yamaizumi et al., 1978). Darüber hinaus ist DT-A in jeder eukaryontischen Zelle gleichermaßen wirksam (Middlebrook & Dorland, 1977). Diese hohe und uneingeschränkte Wirksamkeit macht es zu einem geeigneten Effektorgen für die "Suizidgentherapie". Um eine systemische Toxizität in der Tumorthherapie zu vermeiden, wird für die "Suizidgentherapie" nur die kodierende Sequenz für die A-Kette (DT-A) ohne die B-Kette des Diphtherietoxins eingesetzt. Somit kann das Toxin nicht in andere Körperzellen eindringen (Palmiter et al., 1987) und tötet nur die Zellen, die DT-A selbst exprimieren.

Die Wirksamkeit von DT-A als "Suizidgen" für die Tumorgentherapie wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bestätigt. So konnten Murayama und Kollegen (1999) deutliche Inhibition des Wachstums ihrer Zelllinie nach Transfektion eines DT-A Expressionsplasmids nachweisen und auch Pang (2000) zeigte das Absterben der Zellen nach Transfektion eines für DT-A kodierenden Plasmids *in vitro*. *In vivo* konnten z.B. Kunitomi und Kollegen (2000) die Hemmung des Tumorwachstums nach intratumoraler Injektion eines DT-A-Expressionsplasmids im Mausmodell nachweisen. Allerdings gibt es noch keine Daten zur Wirksamkeit von DT-A als "Suizidgen" in klinischen Studien.

### 1.2.2 Die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase

Aufgrund ihrer geringeren Substratspezifität katalysiert die Thymidinkinase aus dem Herpes-Simplex-Virus, einem doppelsträngigen DNA-Virus, den ersten Schritt bei der Phosphorylierung des Nukleosidanalogons Ganciclovir (GCV) in GCV-Monophosphat mit 1000-fach höherer Effizienz als die zellulären Thymidinkinasen (Moolten, 1986; St Clair et al., 1987). GCV-Monophosphat wird von zellulären Nukleotidkinasen weiter zu GCV-Triphosphat umgesetzt und dieses hemmt die Aktivität der DNA-Polymerase  $\alpha$  und wird als Analog von Deoxyguanosintriphosphat bei der Replikation in die wachsende DNA-Kette eingebaut (Reid et al., 1988; St Clair et al., 1987). Dadurch kommt es zum Kettenabbruch bei der Replikation und schließlich zur Apoptose der Zelle (Culver et al., 1992; Freeman et al., 1993; Moolten, 1986; Wei et al., 1998).

Obwohl mit dem Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase/GCV-System nur sich teilende Zellen abgetötet werden, besteht der große Vorteil dieses Systems im sogenannten "Bystander-Effekt" (Culver et al., 1992; Freeman et al., 1993). Dieser beschreibt die Beobachtung, daß neben den Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase exprimierenden Zellen auch benachbarte, untransduzierte ("Bystander"-) Zellen durch GCV getötet werden. Da bisherige Gentransfer-Methoden nicht effizient genug sind, jede Zelle eines Tumors mit dem therapeutischen Gen zu transfizieren, ermöglicht der "Bystander-Effekt" die Ausweitung des toxischen Effekts von GCV, auch wenn nur ein Teil der Tumorzellen die virale Thymidinkinase exprimiert.

Der Mechanismus des "Bystander-Effekts" wird kontrovers diskutiert. Er wird

mit der Aktivität der viralen Thymidinkinase in der transduzierten/transfizierten Zelle in Zusammenhang gebracht (Chen et al., 1995), aber auch mit der Aufnahme von apoptotischen Vesikeln (Freeman et al., 1993) oder löslichen Faktoren (Princen et al., 1999) durch die benachbarten, nicht transduzierten Zellen. *In vivo* wurde auch die Immunreaktion (Freeman et al., 1995; Ramesh et al., 1996) und die Zerstörung von Blutgefäßen (Ram et al., 1994) als am "Bystander-Effekt" beteiligt beschrieben. Die größte Bedeutung wird jedoch der Übertragung von GCV-Triphosphat durch "Gap Junctions" in benachbarte Zellen zugeschrieben (Bi et al., 1993; Goldberg & Bertram, 1994; Mesnil et al., 1996; Vrionis et al., 1997). "Gap Junctions" sind aus Konnexinen aufgebaute Kanäle mit einem Durchmesser von 2nm, die dem Informationsaustausch benachbarter Zellen dienen und kleinen Molekülen (<1kDa) den Übertritt in die Nachbarzelle erlauben (Simpson et al., 1977). Allerdings unterscheidet sich die Fähigkeit verschiedener Zellen, über "Gap Junctions" zu kommunizieren, was auch zu unterschiedlichen Ausprägungen des "Bystander-Effekts" (Yang et al., 1998) führt.

Das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase/GCV-System ist eines der bestuntersuchten "Suizidgen"-Systeme überhaupt. *In vitro* wie *in vivo* wurden in unterschiedlichen Tumormodellen, z.B. Hirntumoren (Culver et al., 1992), Melanomen (Calvez et al., 1996; Vile & Hart, 1993), Prostatakarzinomen (Shalev et al., 2000), Pankreaskarzinomen (Makinen et al., 2000), Glioblastomen (Berenstein et al., 1999) oder Ovarialkrebs (Nagy et al., 2000), gute Erfolge bis hin zur kompletten Tumorregression erzielt. Das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase/GCV-System wurde schon in zahlreichen klinischen Studien getestet, unter anderem auch beim malignen Melanom (Klatzmann et al., 1998; Morris et al., 2000), beim Prostatakarzinom (Herman et al., 1999) und beim Ovarialkarzinom (Alvarez et al., 2000; Hasenburg et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß die "Suizidgentherapie" mit der viralen Thymidinkinase und anschließende systemische Gabe von GCV sicher durchführbar ist. Allerdings wurden klinische Erfolge bisher nur teilweise nachgewiesen, was auch auf die schlechte Effizienz des Gentransfers zurückgeführt wird (Klatzmann et al., 1998).

### **1.3 Zelltypspezifische "Suizidgen"-Expression durch gewebespezifische Promotoren und Enhancer**

Damit die toxischen Wirkungen der "Suizidgene" auf die Tumorzellen beschränkt bleiben und möglichst keine gesunden Zellen abgetötet werden, ist es wichtig, die Expression der therapeutischen Gene auf die Tumorzellen zu beschränken. Dies wird durch selektive Expression der therapeutischen Gene und zusätzlich eventuell durch selektive Aufnahme der therapeutischen Konstrukte in die maligne Zelle ("Targeting") erreicht. Die selektive Expression wird durch gewebespezifische genregulatorische Elemente (Promotoren, Enhancer) gewährleistet.

Verschiedene zelltypspezifische Promotoren und Enhancer-Elemente, die zur selektiven Genexpression in Melanomzellen eingesetzt werden können, wurden bereits identifiziert und zum Teil gut charakterisiert. Zu diesen gehören die genregulatorischen Sequenzen des Tyrosinasegens (Artuc et al., 1995; Ganss et al., 1994b; Kluppel et al., 1991; Shibata et al., 1992), des "Tyrosinase Related Protein 1" (TRP1)-Gens (Lowings et al., 1992; Yavuzer & Goding, 1994) und des "Melanoma Inhibitory Activity" (MIA)-Gens (Blesch et al., 1994; Bosserhoff et al., 1998 (Übersicht); Bosserhoff et al., 1996; Golob et al., 2000). Während Tyrosinase und TRP1 als Differenzierungsantigene in benignen und malignen melanozytären Zellen exprimiert werden, wurde für MIA nur eine Expression in Melanomzellen und einigen anderen Tumorzellen sowie in Chondrozyten beschrieben (Bosserhoff et al., 1996; Bosserhoff et al., 1997b; Bosserhoff et al., 1999; Perez et al., 2000). Für den Tyrosinasepromotor wurde schon in verschiedenen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gezeigt, daß er sich zur spezifischen Genexpression in Melanomzellen eignet (Siders et al., 1998; Vile & Hart, 1993), während dies für den MIA-Promotor bisher noch nicht untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden der murine Tyrosinase- und der humane MIA-Promotor als zelltypspezifische Promotoren zur selektiven Expression in Melanomzellen verwendet. Desweiteren wurde die Aktivität des unspezifischen Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasepromotors in Kombination mit melanozytenspezifischen Enhancerelementen untersucht. Die Sequenzabschnitte der verwendeten Promotoren sind in Abb. 1.2 dargestellt.

### Maus-Tyrosinasepromotor:

```

-305 atgatctcta aatacaacag gcttgatttc agaactctaga tgtttcatga cctttattca taagagatga
-235 tgtattcttg atactacttc tcatctgcaa attccaatta ttattaattt catatcaatt agaataatat
-165 atcttccttc aatttagtta cctcactatg ggctatgtac aaactccaag aaaaagttag M-Box tcatgtgctt
-95 TATA-Box tgcagaagat E-Box aaaagcttag Oct1 tgtaaaacag gctgagagta tttgatgtaa Sp1 TATA-Box gaaggggagt TATA-Box ggttataatg
-25 gtcttagcca aaacatgtga E-Box tagtca+ctcc aggggttgct ggaaaagaag tctgtgacac tcattaacct
+46 attggtgcag attttgatg atctaaagga gaaaATGTC TTGGCTGTT TGTATTGCCT TCTGTGGAGT

```

### humaner MIA-Promotor:

```

-1316 tctagacana taaaaataaa agaaatcatc caagaatggt gacttgccta ctattctact cgagaggctg
-1246 agaggggagg atttcttgag cccaggagtt tgaggatgca gtgagctatg atcacatcac tgtacttcag
-1176 cctgagcaac agcaagatcc tgtctcaaaa aattaaatta ggctgggctt ggtggctcat gcctgtaatc
-1106 ccagcacttt ggaagccat ggtgggcaga ttgcttgagc ccaggagttt gagacgaggt gggcaacatg
-1036 acgaaacccc ggctctacca aaaaatacaa aaaattaact gggcataatg gtacatgtct gtggtcccag
-966 ctactcggta ggctgagggt ggaggaatgc ttgagcccag gaaatagggg ctacagtga ccaggatgat
-896 gccagtgcac tccaacctgg gcaacagagc aagactctac ctcaaaataa tttaaaaaaa tggattaatt
-826 gggaataggt ggcttggtgc ttagtccca gttactcagg aggctgaggt gggaggattg cctgagtcta
-756 ggaggttgag gctgcagtga gccgggatgg taccattgca ctccacctgg gaacaggggtg agaccctgtc
-686 tcaaaaaaga aaaaaaggg aggggttata atcactctc ctgacatgat acagagtatc catttgagtt
-616 cataacataa atatgtactt ggtgaatgct ctgtaactat tggatgaatgc tctgtaacta CTF/NF-1 tgggcttttt
-546 tattgttccc attttacata taaggaagct gaggtttgt gaggagaaat agcttagccc aggtcatcca
-476 gtgggaagcg tctggtgaag aggaatagtg atcatggtgg gactttgcct agcctaagggt tcagcataca
-406 atattcagtc agtactcaag ggctgggctg tttctggtaa tcaaagggtc gccttgctct cctgcccac
-336 agcaggaaat tccaagggtg ttttctttac aggtcctctc gcttctgtgg ccagagggga cagcggagga
-266 gccagggtac ctaagccaac tcaagagaag atggaattga atatttcaac caccttatct aggcctctgt
-196 gattgttgag gagggggctg tctctgggaa agttgtgagc tgctttggac cttatctggg NF-κB HCR aatttctt
-126 ggcttacagc ctttacccta tcttgaaat ggttctggt tcatagcaac ttctaggtgg tgtgggcgaa
-56 gtttgggact ggtttagggc Sp1 ggggacaaga ccaagaacac aagtttcctt gtacta+ggga gagaggagg
+15 ggaggaaatt ggagacccca gcacccctt gctcactctc ttgctcacag tccacgATGG CCCGGTCCCT

```

### Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasepromotor

```

-112 gatccggccc Sp1 cgcccagcgt cttgtcattg CCAAT-Box gcgaattcga acacgcagat gcagtcgggg Sp1 cggcgcggtc
-42 cgagggtccac ttcgcataatt TATA-Box aaggtgacgc gtgtggcctc ga+acaccgag cgaccctgca gcgacccgct
+29 taacagcgtc aacagcgtgc cgcagatct

```

**Abb. 1.2: Promotorsequenzen.** Gezeigt sind die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen des murinen Tyrosinase-, des humanen MIA- und des Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasepromotors sowie die im Text genannten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dunkel hinterlegt sind die M-Box-, E-Box-, TATA-Box-, CCAAT-Box- und HCR ("Highly Conserved Region")-Sequenzen, unterstrichen sind die Bindungsstellen/Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Oct1, CTF/NF-1 und NF-κB. Mit "+1" ist das Nukleotid des Transkriptionsstarts bezeichnet, die kodierende Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt.

## 1.3.1 Der Tyrosinasepromotor

Die Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melanogenese in den pigmentierten Zellen der Haut (Melanozyten) und der Retina. Es katalysiert die beiden geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei der Synthese von Melanin aus Tyrosin: die Oxidation von Tyrosin zu DOPA (Dihydroxyphenylalanin) und die Oxidation von DOPA zu DOPAquinon (zur Übersicht: Hearing & Jimenez,



1989). Weitere an der Melaninsynthese beteiligte Enzyme sind das "Tyrosinase Related Protein 1" (TRP1) und das "Tyrosinase Related Protein 2" (TRP2). Das Tyrosinasegen der Maus liegt auf dem Albino (c)-Locus (Silvers, 1979) auf Chromosom 7, hat eine Länge von 80kb und ist in fünf Exons unterteilt (Muller et al., 1988; Ruppert et al., 1988).

Die Funktion des murinen Tyrosinasepromotors wurde in transgenen Mäusen untersucht und eine Aktivität nur in Melanozyten der Haut und dem Pigmentepithel der Retina nachgewiesen (Beermann et al., 1990; Kluppel et al., 1991; Tanaka et al., 1990). Kluppel und Mitarbeiter (1991) identifizierten 270bp des Tyrosinasepromotors als ausreichend für die Vermittlung der zelltypspezifischen Aktivität. Dieses 270bp lange Promotorelement aus dem Maus-Tyrosinasegen vermittelt stärkere spezifische Genexpression in humanen Melanomzellen als der humane Tyrosinasepromotor (Shibata et al., 1992) und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit anstatt des humanen Promotors verwendet.

Im murinen Tyrosinasepromotor wurden verschiedene Sequenzelemente identifiziert (vgl. Abb. 1.2), unter anderem eine Sp1-Bindungsstelle bei Nukleotid -43 bis -33 (Bentley et al., 1994) und zwei TATA-Boxen bei -29 und -83 (Kwon et al., 1989; Shibahara et al., 1990), die zur Initiation an zwei unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten jeweils etwa 30 Nukleotide stromabwärts jeder TATA-Box führen (Kwon et al., 1989; Ruppert et al., 1988).

Homologien zwischen dem humanen und murinen Promotor bestehen unter anderem in einer Sp1- und einer Oct-1-Bindungsstelle an ähnlicher Position sowie in einer M- und einer E-Box. Bei der M-Box zwischen den Nukleotiden -107 und -97 und der E-Box nahe des Initiators (-12 bis -7) handelt es sich um zwischen verschiedenen Spezies (Bentley et al., 1994), aber auch zwischen Tyrosinase-, TRP1- und TRP2-Promotor hochkonservierte Sequenzelemente (Jackson et al., 1991; Lowings et al., 1992; Shibahara et al., 1991; Yokoyama et al., 1994). Sowohl ihr Abstand als auch ihre Nukleotidsequenz sind stark konserviert und essentiell für die Promotorfunktion (Bentley et al., 1994). Sie enthalten das Sequenzmotiv CATGTG, welches ein Bindungsmotiv für "basic Helix-Loop-Helix" (bHLH)-Transkriptionsfaktoren darstellt (Kadesch, 1993), und vermitteln durch die Bindung des bHLH-Proteins Mi, das Genprodukt des

Microphthalmia-Gens (Hodgkinson et al., 1993), die melanozytenspezifische Aktivierung des Tyrosinasepromotors (Bentley et al., 1994; Bertolotto et al., 1996).

### **1.3.1.1 Enhancer des humanen Tyrosinasepromotors**

Für den humanen Tyrosinasepromotor wurden noch weitere Promotorelemente mit dem CATGTG-Sequenzmotiv beschrieben (Shibata et al., 1992; Yasumoto et al., 1994), die eine wichtige Rolle für die melanozytenspezifische Genexpression spielen. Hierbei handelt es sich um das "Tyrosinase Proximal Element" (TPE, Position -112 bis -93), einen schwachen Enhancer, und das "Tyrosinase Distal Element" (TDE; Position -1861 bis -1842), ein starkes Enhancerelement (Yasumoto et al., 1994). Yasumoto und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, daß TDE den Tyrosinasepromotor durch Bindung des humanen Homologs von Mi, dem "Microphthalmia Associated Transcription Faktor" (MITF; Tachibana et al., 1994), pigmentzellspezifisch transaktiviert.

### **1.3.1.2 Enhancer des murinen Tyrosinasepromotors**

Im murinen Tyrosinasegen wurde von Ganss et al. (1994a) 12,1kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts ein starker melanozytenspezifischer Enhancer beschrieben und analysiert. Die Enhanceraktivität konnte auf 200bp eingegrenzt werden und ihre Funktionalität ist unabhängig von der Orientierung. Das Enhancerelement enthält die Pallindromsequenz TGACTTTGTCA, welche eine Schlüsselfunktion in der Funktionalität des Enhancers einnimmt. Die 200bp lange Sequenz enthält Konsensussequenzen für die allgemeinen Transkriptionsfaktoren CREB ("cAMP Responsive Element Binding") und AP-1. *In vitro* konnte jedoch nur die Bindung eines melanozytenspezifischen Proteinkomplexes nachgewiesen werden, welcher vermutlich Fos oder einen mit Fos verwandten Faktor enthält.

### **1.3.2 Der MIA-Promotor**

Das "Melanoma Inhibitory Protein" (MIA), ein 11kDa Protein, wurde *in vitro* aus dem Überstand von Melanomzellen isoliert und als ein von Melanomzellen sezernierter autokriner wachstumshemmender Faktor beschrieben (Blesch et

al., 1994; Bogdahn et al., 1989). *In vivo* Untersuchungen zeigen jedoch einen Zusammenhang zwischen MIA-Sekretion und steigender Malignität (Bosserhoff et al., 1996; Deichmann et al., 1999; Djukanovic et al., 2000; Juergensen et al., 2000) und lassen den Schluß zu, daß MIA durch Hemmung der Interaktion von Zellmembran und extrazellulärer Matrix die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen fördert (Bosserhoff et al., 2001; Bosserhoff et al., 1998 (Übersicht); Guba et al., 2000; Stoll et al., 2001).

Die MIA-Expression ist streng reguliert und konnte nur in Chondrozyten und Melanomzellen (Blesch et al., 1994; Bosserhoff et al., 1996; Bosserhoff et al., 1997a) sowie in einigen anderen Tumorzellen (Bosserhoff et al., 1999; Perez et al., 2000) nachgewiesen werden, nicht jedoch in Melanozyten (van Groningen et al., 1995) oder anderen benignen Zellen. Diese strenge Regulation ist auf den MIA-Promotor zurückzuführen, der deshalb zur zelltypspezifischen Expression in Melanomzellen besonders geeignet scheint.

Bosserhoff und Mitarbeiter identifizierten verschiedene Proteinbindungsstellen sowie den Transkriptionsstartpunkt bei der Analyse eines 1386bp langen Sequenzabschnitts des humanen MIA-Promotors stromaufwärts des Translationsstarts (Bosserhoff et al., 1996; Bosserhoff et al., 1997b) (vgl. Abb. 1.2). Der Transkriptionsstart befindet sich etwa 70bp stromaufwärts des Translationsstartpunkts und es konnten Konsensussequenzen für SP-1 an Position -35 (bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt), für NF- $\kappa$ B bei Position -130 und für CTF/NF-1 bei -555 identifiziert werden, jedoch keine TATA-Box oder CCAAT-Box. Durch Untersuchungen an Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß 493bp stromaufwärts des Translationsstarts notwendig und ausreichend für ein hohes Maß an melanomzellspezifischer Genexpression sind (Bosserhoff et al., 1996). Erst vor kurzem wurde ein melanomzellspezifisches Enhancerelement innerhalb des murinen MIA-Promotors identifiziert (Golob et al., 2000). Es enthält einen zwischen Maus und Mensch hochkonservierten Sequenzabschnitt von 10bp, genannt "Highly Conserved Region" (HCR), der im humanen Promotor zwischen Nukleotid -138 und -129 (bezogen auf den Transkriptionsstart) liegt (vgl. Abb. 1.2) und zumindest in Maus-Melanomzellen den melanomspezifischen Transkriptionsfaktor MATF ("Melanoma-associated Transcription Factor") bindet

(Golob et al., 2000). Das HCR-Element scheint nur in Melanomzellen, nicht aber in Chondrozyten eine Rolle bei der MIA-Expression zu spielen (Xie et al., 1999), was auf eine unterschiedliche Regulation der MIA-Expression in Chondrozyten und Melanomzellen hindeutet.

### **1.3.3 Der Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasepromotor**

Das Herpes-Simplex-Virus (HSV) kodiert in seinem Genom etwa 75 Gene (McGeoch et al., 1988 (Übersicht); McGeoch et al., 1986), deren Expression während eines Infektionszyklus zeitlich streng reguliert ist. Zuerst werden die "immediate-early" oder  $\alpha$ -, dann die "delayed-early" oder  $\beta$ - und zuletzt die "late" oder  $\gamma$ -Gene aktiviert (Honess & Roizman, 1974; Honess & Roizman, 1975). Die  $\beta$ -Gene werden für die Virusreplikation benötigt und zu ihnen gehört auch die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase.

Der virale Thymidinkinasepromotor ist in vielen Säugerzellen funktionell, wird also nicht zelltypspezifisch aktiviert, allerdings zeigt er in nicht virusinfizierten Zellen nur äußerst schwache Aktivität (Eisenberg et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, daß 105bp des Thymidinkinasepromotors stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts für die maximale Promotoraktivität sowohl in *Xenopus* Oozyten (McKnight et al., 1981) als auch in HeLa (Eisenberg et al., 1985; ElKareh et al., 1985) ausreichen.

Neben einer TATA-Box zwischen Nukleotid -27 und -20 enthält der Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasepromotor verschiedene Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (vgl. Abb. 1.2), darunter zwei Sp1-Bindungsstellen (-106 bis -97 und -56 bis -47) und eine inverse CCAAT-Box (-86 bis -82) (zur Übersicht: Jones et al., 1988; McKnight & Tjian, 1986). Die zellulären Transkriptionsfaktoren gewährleisten die Grundaktivität des viralen Thymidinkinasepromotors in eukaryonten Zellen. Während einer HSV Infektion wird die Aktivität der zellulären Transkriptionsfaktoren von den im Virusgenom kodierten "immediate-early" Proteinen moduliert und somit die Expressionsrate der Thymidinkinase reguliert (Kwun et al., 1999).

## **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Plasmidkonstrukten zur Gentherapie des malignen Melanoms. Diese Plasmide sollen die selektive und effiziente Expression von "Suizidgenen" in Melanomzellen gewährleisten.

Um "Suizidgene" selektiv und effizient zu exprimieren, sollte die Aktivität der zelltypspezifischen Promotoren aus dem murinen Tyrosinase- und dem humanen MIA-Gen sowie die des unspezifischen Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors durch Fusion mit melanozytenspezifischen Enhancerelementen selektiv in Melanomzellen gesteigert werden.

Anschließend sollte die Abtötung von Melanomzellen durch die Expression der direkt zytotoxischen A-Kette des Diphtherietoxins und des "Prodrug"-aktivierenden Enzyms Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase als "Suizidgene" unter der Kontrolle der zelltypspezifischen Promotorkonstrukte untersucht und verglichen werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### A Material

#### Chemikalien und Reagenzien

- Agarose ..... Gibco BRL, Sigma
- Ampicillin..... Sigma
- [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP ..... Amersham
- Aqua ad injectabilia ..... Braun
- AquaPhenol, pH 7,5 ..... Appligene Oncor
- Bromphenolblau Natriumsalz ..... Merck
- BSA (Rinderserumalbumin) (Pentax Fraktion V) ..... Sigma
- Calciumchlorid-Dihydrat ..... Merck
- Chloroform ..... Apligene Oncor
- D(+)-Glucose (Monohydrat) ..... Merck
- Dextransulfat (Natriumsalz)..... Pharmacia Biotech
- Dimethylpyrocarbonat (DMPC) ..... Sigma
- Dimethylsulfoxid (DMSO) ..... Merck
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ..... Merck
- 1.4-Dithiothreitol (DTT)..... Boehringer
- DNA-Marker: Perfect 1 kb DNA Ladder..... NatuTec
- Ethanol absolut ..... Riedel-de-Haen
- Ethidiumbromid ..... Merck
- Ethylendiamintetraessigsäure-Disodium (EDTA)..... Gerbu
- Ficoll Typ 4000..... Pharmacia
- Formaldehydlösung 37%. ..... Merck
- Formamid..... Merck
- fötales Rinderserum ..... Gibco BRL
- Fugene 6 Transfektionsreagenz..... Roche
- Ganciclovir: "Cymeven"..... Roche
- Glycerol (Glycerin) ..... Roth
- Hefeextrakt ..... Difco
- Isopropanol (2-Propanol) ..... Riedel-de Haen
- Kanamycin ..... Gibco BRL
- Lachssperm DNA-Lösung ..... Gibco BRL
- Lipofectin ..... Gibco BRL
- L-Glutamin (200 mM) ..... Biochrom KG
- Magnesiumchlorid ..... Merck
- 2-Mercaptoethanol ..... Merck, Roth
- Methanol ..... Riedel-de-Haen
- MOPS (3-[N-morpholino]-2-hydroxypropansulfonic acid) ..... Sigma
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenoltetrazolium-Bromide) ..... Sigma
- Natriumacetat wasserfrei ..... Merck
- Natriumcarbonat ..... Merck
- Natriumchlorid..... Fluka
- Natriumcitrat-Dihydrat ..... J.T. Baker
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ..... Merck

---

|   |             |
|---|-------------|
| • Nukleotid Mix .....   | Promega     |
| • One-Phor-All Puffer.....  | Amersham    |
| • ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) .....                                   | Sigma       |
| • PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ..... | Biochrom KG |
| • PCR Puffer Bio Therm™ .....   | Gene Craft  |
| • Penicillin/Streptomycin (1000 U/ 1000µg/ml).....                                  | Biochrom KG |
| • Phenol/Chlorophorm: Roti®-Phenol-Chlorophorm.....                                 | Roth        |
| • Phenol: Roti®-Phenol.....   | Roth        |
| • Polyvinylpyrrolidon .....   | Calbiochem  |
| • RPMI 1640 (2g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin) .....                       | Biochrom KG |
| • Select Agar .....   | Gibco BRL   |
| • Sodium-dodecylsulfat 4x (SDS) .....   | Gerbu       |
| • Tris-Base: Trizma® Base .....   | Sigma       |
| • Trypanblau (0,5%(w/v)).....   | Biochrom KG |
| • Trypsin/EDTA (10fach).....  | Biochrom KG |
| • Trypton Pepton .....  | Difco       |

## Geräte

|   |                              |
|---|------------------------------|
| • Autoclav: HiClave HV-85.....                        | Hirayama                     |
| • Brutschränke: US AutoFlow .....                     | Nuaire                       |
| • Crosslinker: UV Stratalinker 2400 .....             | Stratagene                   |
| • Cryo-Einfriergerät.....                             | Nunc                         |
| • Eismaschine: Scotsman AF-10 .....                   | Scotsman                     |
| • Electrophorese-Netzgeräte: Power Pac 300 .....      | BioRad                       |
| • ELISA-Reader: Anthos 2010 .....                     | Anthos Labtec<br>Instruments |
| • Entwicklermaschine: Curix 60 .....                  | Agfa                         |
| • FACScan mit Software Cellquest .....                | Beckton Dickinson            |
| • Gelapparatur für RNA- und DNA-Gele horizontal ..... | BioRad                       |
| • Geldokumentation: Gel Doc 1000 .....                | BioRad                       |
| • Inkubatoren:  |                              |
| • Function Line .....                                 | Heraeus                      |
| • Innova 4230 .....                                   | New Brunswick<br>Scientific  |
| • Kühlschränke (4°C, -20°C).....                      | Liebherr                     |
| • Kühlschrank (-80°C).....                            | Forma Scientific             |
| • Magnetrührer: MR 3002 .....                         | Heidolph                     |
| • Mikroskope:   |                              |
| • DMIL .....  | Leica                        |
| • DMLS.....   | Leica                        |
| • Mikrowelle .....                                    | Siemens                      |
| • Neubauer Zählkammer .....                           | Brand                        |
| • PCR Maschine: Peltier Thermal Cycler 200 .....      | Biozym                       |
| • pH-Meter: MP 220.....                               | Mettler Toledo               |
| • Photometer: Ultrospec 3000.....                     | Pharmacia Biotec             |
| • Pipetten:   |                              |
| • Eppendorf Research .....                            | Eppendorf                    |
| • 8-Kanal-Pipette .....                               | Eppendorf                    |
| • Multipipette .....                                  | Eppendorf                    |
| • Pipettierhilfe: accu-jet®.....                      | Brand                        |
| • Reinstwasser-Anlage: Seralpur Delta UV/UF .....     | USF Seral                    |

- Schüttler:
  - GFL 3005 ..... GFL
  - MTS 4 ..... IKA
- Schweißgeräte:
  - 100 GE ..... Polystar
  - Haushaltsgerät ..... Severin
- Sterilbank: SterilGard Class II Type A/B 3 ..... The Baker Company
- Sterilisator ..... WTB Binder
- Stickstofftank: Chronos Biosafe ..... Messer Griesheim
- Thermoblock:
  - Thermomixer Compact ..... Eppendorf
  - Thermomixer 5436 ..... Eppendorf
- Vortexer:
  - MS1 Minishaker ..... IKA
  - Reax 2000 ..... Heidolph
- Waagen:
  - BP 210 S ..... Sartorius
  - BP 3100 P ..... Sartorius
- Wasserbäder:
  - DC-1 ..... Haake
  - Medigen W6 ..... Medigen
  - Schüttelwasserbad SW20 ..... Julabo
- Zentrifugen:
  - Biofuge Fresco ..... Heraeus
  - Biofuge Pica ..... Heraeus
  - RT 7 mit Rotor RTH-250 ..... Sorvall
  - Super T21 mit Rotor ST-H750 und SL-50T ..... Sorvall

## Verbrauchsmaterialien

- Einfrier-Röhrchen (steril) 2 ml ..... Greiner
- Einweg-Plastikpipetten ..... Sarstedt
- Eppendorf Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5 bzw. 2 ml) ..... Eppendorf
- FACS<sup>®</sup>-Röhrchen ..... Beckton Dickinson
- Falcon Reaktionsgefäße (steril, 15 bzw. 20 ml) ..... Falcon
- Filmkassetten, Verstärkerfolie ("Intensifying Screen") ..... Dr. Goos-Suprema
- Gewebekulturflaschen (250, 550 ml) ..... Greiner
- Gewebekulturplatten (24- und 96 Kavitäten) ..... Greiner
- Glaspipetten (1, 2, 5, 10 und 20 ml) ..... Hirschmann  
Laborgeräte
- Nylon-Membran (Porengröße 0,45µm) ..... Boehringer
- Pasteurpipetten ..... WU Mainz
- Petrischalen ..... Greiner
- Pipettenspitzen ..... Eppendorf, Gilson,  
Greiner, Brand, Roth
- Plastikdose ..... Tupperware
- Prospekthüllen ..... Esselte
- Röntgenfilme X-Omat ..... Kodak
- Spritzen (10 und 50ml) ..... Terumo
- Spritzen (2 und 5ml) ..... Beckton Dickinson



- Sterilfilter:
  - Celtron 30/0,2 CA-GF92-S (0,2µm) ..... Schleicher & Schuell
  - Ready-to-use Filter Holders (0,2 und 0,4µm) ..... Renner
  - Steritop (0,2µm) ..... Schleicher & Schuell
- Suspensionskulturflaschen 250ml ..... Greiner
- Whatman-Papier ..... Schleicher & Schuell

### Kits

- CAT-ELISA ..... Roche
- Expand High Fidelity PCR System ..... Roche
- High Prime ..... Boehringer
- Jet Quick Purification Kit ..... Genomed
- QIAfilter Plasmid Midi und Maxi Kits ..... Qiagen
- QIAprep Spin Miniprep Kit ..... Qiagen
- QIAquick Gel Extraction Kit ..... Qiagen
- QIAquick Nucleotide Removal Kit ..... Qiagen
- QIAquick PCR Purification Kit ..... Qiagen
- QIAshredder ..... Qiagen
- RNeasy Mini Kit ..... Qiagen

### Enzyme

- DNA-Polymerase I Klenow Fragment ..... Pharmacia Biotech
- DNaseI (RNase frei) ..... Roche
- β-Galaktosidase ..... Sigma
- Phosphatase, alkalische, Shrimp ..... Roche
- Restriktionsendonukleasen ..... Amersham, Gibco  
BRL, MBI Fermentas,  
NatuTec
- T4 DNA-Ligase ..... Promega
- Taq-Polymerase ..... Qiagen
- Taq-Polymerase BioTherm ..... Gene Craft

### Zelllinien

- B16 ..... Maus-  
Melanomzelllinie
- HeLa ..... humane  
Cervixkarzinomzelllinie
- MeWo ..... humane  
Melanomzelllinie
- SK-Mel-23 ..... humane  
Melanomzelllinie
- UKRV-Mel-6a ..... humane  
Melanomzelllinie

### Bakterienstamm

- E. coli XL2 blue

## Plasmide

- pBLCAT6: enthält das CAT-Gen ohne Promotor ..... Luckow & Schutz, 1987
- pCAT3control: enthält das CAT-Gen, SV40-Promotor und -Enhancer . Promega
- pCAT3promoter: enthält das CAT-Gen, SV40-Promotor ..... Promega
- pCAT-MIA-1386: enthält 1386bp *Bam*HI/*Xba*I MIA-Promotorfragment vor dem CAT-Gen in pBLCAT2 (Luckow & Schutz, 1987)..... Bosserhoff et al., 1996
- pCMV CAT: enthält das CAT-Gen (775bp/*Bam*HI) unter der Kontrolle des CMV-Promotors
- pCMV $\beta$ : enthält das  $\beta$ -Galaktosidasegen unter der Kontrolle des CMV-Promotors ..... Clontech
- pCR3.1: enthält den CMV-Promotor ..... Invitrogen
- pEGFP-IRES-hyg: enthält das EGFP-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors ..... Clontech
- pGL3-3xTDE-SV40P: enthält 3 Kopien des TDE (Yasumoto et al., 1994) in *Sac*I/*Xho*I des pGL3promoter-Vectors (Promega) ..... S. Hemmi (Institut für Molekularbiologie, Zürich)
- pGL3-9xTDE-SV40P: enthält 9 Kopien des TDE (Yasumoto et al., 1994) in *Sac*I/*Xho*I des pGL3promoter-Vectors (Promega) ..... S. Hemmi (Institut für Molekularbiologie, Zürich)
- phsTyr(0,2)CAT: enthält das 200bp Tyrosinase-Enhancerfragment und ein 270bp Tyrosinasepromotorfragment ..... Ganss et al., 1994a
- pIBI30-DT-A: enthält die kodierende Sequenz für DT-A ..... Maxwell et al., 1986
- pSKHSVtk (neu): enthält die kodierende Sequenz für TK (aus pGT60hAngio, InvivoGen) in pBlueskript II SK (+/-) (Stratagene) zwischen *Xho*I und *Sac*I ..... U. Haberkorn (DKFZ Heidelberg)
- pTyr1CAT: enthält ein 270bp Tyrosinasepromotorfragment vor dem CAT-Gen und entspricht pPCAT aus Artuc et al. (1995) ..... Artuc et al., 1995
- pUC18 ..... Amersham Pharmacia

## Primer

- AP-Mia antisense: 5'-CTGAGCTCACTGGCAGTAGAAA-3'
- AP-Mia sense: 5'-TCACAGTCCACGATGGCCCGGT-3'
- AP-Tyr1: 5'-ACCTGCATGCGTCGACAGTTCCTGCCAGCTGACTTTGTCAAGACAG-3'
- AP-TYR-1-2: 5'-ACCTAAGCTTGTGTCGACAGTTCCTGCCAGCTGACTTTGTCAAGACAG-3'
- AP-Tyr2: 5'-GTTACTCGAGTGCCAGGACCCAGCAGAAGCAGCTGACAC-3'
- BGH Eco5': 5'-CCGAAAGAATTCTCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG-3'
- BGH Hind5': 5'-CCGAAAAAGCTTTCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG-3'
- BGH Sal3': 5'-CCGAAAGTCGACCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCT-3'
- BGH-5-Kpn: 5'-CCGAAAGGTACCTCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG-3'
- BGH-polyA-3: 5'-CCGAAAGAATTCACCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCT-3'
- BGH-polyA-5: 5'-CCGAAAGATCTTCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG-3'
- BGHSac-5: 5'-CCGAAAGAGCTCTCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG-3'
- DiphKpn-3: 5'-ATTAGGTACCGGTTCTTCACAAAGATCGCCTGACACG-3'
- DiphSac-3: 5'-ATTAGAGCTCGGTTCTTCACAAAGATCGCCTGACACG-3'
- DiphXho-5: 5'-ATTACTCGAGCCATGGATCCTGATGATGTTGTTGATTG-3'
- GAPDH forward: 5'-GTTTACATGTTCCAATATGATTCCAC-3'
- GAPDH reverse: 5'-TCATATTTGGCAGGTTTTCTAGAC-3'

|            |  |
|------------|--|
| •TK Bam5`: | 5`-ATTAGGGATCCAGCATGGCTTCGTACCCCTGCCATC-3` |
| •TK Sac3`: | 5`-ATTAGGAGCTCTCAGTTAGCCTCCCCATCTCCCGG-3`  |
| •TK-3:     | 5`-ATTAGGGTACCGGATCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCC-3` |
| •TK-5:     | 5`-ATTAGCTCGAGCCGCGTATGGCTTCGTACCCCTGCC-3` |
| •Tyr-1:    | 5`-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3`                 |
| •Tyr-2:    | 5`-AGGCATTGTGCATGCTT-3`                    |
| •Tyr-3:    | 5`-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3`                 |
| •Tyr-4:    | 5`-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3`                 |

## **B Methoden**

### **2.1 Methoden der Zellkultur:**

#### **2.1.1 Kultivierung von Zellen**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen in einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen und sterilen Geräten durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in Vollmedium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und in gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre kultiviert. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 1200 UpM in einem Sorvall RTH-250 oder ST-H750 Rotor für 10 Minuten bei ca. 20°C.

#### **2.1.2 Passagieren von Zellen**

Wenn die Zellen konfluent sind, müssen sie verdünnt in neue Kulturflaschen umgesetzt werden. Adhärente Zellen haften über Peptidbindungen am beschichteten Boden der Gewebekulturgefäße. Diese können mit Trypsin gelöst werden.

##### **Materialien:**

|                  |   |
|------------------|---|
| Vollmedium:      | RPML 1640 (2g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin)<br>10% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert 30 min. bei 56°C)<br>2% (v/v) L-Glutamin (200mM)<br>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (1000U/1000µg/ml) |
| PBS:             | Biochrom KG   |
| 2x Trypsin/EDTA: | Biochrom KG   |

##### **Durchführung:**

Das Medium wurde aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen, das die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen würde. Anschließend wurden 3ml (pro 550ml Kulturflasche), 1,5ml (pro 250ml Kulturflasche) bzw. 0,2ml (pro Well einer 24-Well-Platte) Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und bei RT oder 37°C wenige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst haben. Die Trypsin-Reaktion wurde dann durch Zugabe von 20ml (550ml Kulturflasche), 10ml (250ml Kulturflasche), bzw 1ml (Well einer 24-Well-Platte) Vollmedium gestoppt, die Zellen 10 Minuten bei 1200 UpM in einem Sorvall RTH-250 oder ST-H750 Rotor zentrifugiert und das Zellsediment in Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in gewünschter Dichte in neue Kulturflaschen ausgesät.

### 2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

**Materialien:**

|                 |  |
|-----------------|--|
| Einfriermedium: | 90% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 10% (v/v) DMSO |
| Vollmedium:     | s. 2.1.2   |

**Durchführung:**

Eukaryontische Zellen können in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zum Einfrieren wurden Zellpellets in Einfriermedium aufgenommen, in 1 ml Aliquots ( $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) auf Einfrier-Röhrchen aufgeteilt und in vorgekühlte Einfriergefäße (Cryo-Einfriergeräte) gegeben. DMSO entzieht den Zellen während des Einfrierens aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften Wasser und verhindert so die Bildung zellschädigender Eiskristalle. Die Zellen wurden zunächst auf  $-80^\circ\text{C}$  heruntergekühlt und nach 24-48 h in flüssigen Stickstoff überführt. Aufgrund der bei Raumtemperatur toxischen Eigenschaften des DMSO muß bis zum Zeitpunkt des Einfrierens ständig gekühlt und möglichst rasch gearbeitet werden.

Um die Zelllinien zu rekultivieren, wurden die tiefgefrorenen Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  fast aufgetaut. Das vollständige Auftauen der Zellen ist hierbei zu vermeiden, um die toxische Wirkung des Einfriermediums so gering wie möglich zu halten. Nach dem Auftauen muß das nun toxische DMSO schonend entfernt werden. Die Zellen wurden in 9ml Vollmedium aufgenommen, einmal abzentrifugiert und in einer Kulturflasche in Vollmedium ausplattiert.

### 2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Kammer

**Materialien:**

|             |                    |
|-------------|--------------------|
| Trypanblau: | 0,18% (w/v) in PBS |
|-------------|--------------------|

**Durchführung:**

Zur Bestimmung von Zellzahl und Lebendzellzahl wurden aus frisch suspendierten Zell-Lösungen Aliquots entnommen, in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau (0,18%) gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau lagert sich an Proteinstrukturen des Cytoplasmas an, kann jedoch nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen und färbt so selektiv tote Zellen bläulich an. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$

### 2.1.5 Transiente Transfektion

Um die Aktivität des Tyrosinase- und des MIA-Promotors, die zytotoxische Wirkung der TK- und DT-A-Expressionsplasmide sowie die Transfektionseffizienz in Melanom- und Kontrollzelllinien zu untersuchen, wurden diese Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert. Da eukaryotische Zellen DNA nicht effizient aufnehmen, muß die DNA mit einem Transfektionsreagenz vorinkubiert werden. In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz "FuGENE6" (nicht-liposomale Lipide) von Roche eingesetzt.

Alle Transfektionen wurden in 24-Well-Platten durchgeführt.

#### Materialien:

|  |             |
|--|-------------|
| RPMI 1640<br>(2g/l NaHCO <sub>3</sub> ,<br>ohne L-Glutamin): | Biochrom KG |
| Vollmedium:  | s. 2.1.2    |
| Fugene6:   | Roche       |

#### Durchführung:

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 24-Well-Platten in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  Zellen pro Well (je nach Experiment) ausgesät, damit sie vollständig adhärieren konnten.

Zunächst wurden pro Well 3µl Fugene6 zu 100µl RPMI 1640 (ohne Zusätze) gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz pro Well mit je 1µg Plasmid-DNA vermischt, ggf. kurz abzentrifugiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit Vollmedium auf ein Volumen von 1ml/Well aufgefüllt.

Das Medium wurde von den am Vortag vorbereiteten Zellen abgenommen und durch je 1ml des Transfektionsgemisches ersetzt. Es wurden immer mindestens drei Wells pro DNA-Konstrukt identisch behandelt (Dreifachbestimmung).

Da das Transfektionsgemisch kaum toxisch für die Zellen ist, blieb es je nach Experiment mindestens 40 Stunden auf den Zellen.

### 2.1.6 MTT-Test

Die aktiven Mitochondrien lebender Zellen nehmen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenoltetrazolium-Bromide) auf und wandeln es durch Reduktion in Formazankristalle um. Die Menge des gebildeten Formazan ist proportional zur Zahl der lebenden Zellen.

Der MTT-Test wurde zur Bestimmung des Anteils überlebender Zellen 4 bzw. 5 Tage nach Transfektion (2.1.5) mit DT-A- bzw. TK-Expressionsplasmiden eingesetzt.

**Materialien:**

|             |   |
|-------------|---|
| MTT-Lösung: | 5mg/ml MTT in PBS<br>sterilfiltriert und dunkel bei 4°C gelagert        |
| Meßmedium:  | 20% (v/v) Vollmedium (s. 2.1.2), 70% (v/v) PBS,<br>10% (v/v) MTT-Lösung |
| PBS:        | Biochrom KG   |
| DMSO:       | Merck   |

**Durchführung:**

Das Medium in der 24-Well-Platte wurde verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 0,5ml Meßmedium pro Well zugegeben und die Gewebekulturplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für vier Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand verworfen und 0,5 oder 1ml DMSO zugegeben und die Gewebekulturplatte etwa 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen vollständig lysiert und die Formazankristalle gelöst.

Für die photometrische Messung in einem ELISA-Reader wurden aus jedem Well der 24-Well-Gewebekulturplatte 100µl in ein Well einer 96-Well-Platte übertragen. Als Leerwert enthielt die erste Reihe 100µl DMSO pro Well. Anschließend wurde die optische Dichte bei 540nm gemessen.

## 2.2 Immunologische Methoden:

### 2.2.1 Detektion GFP-exprimierender Zellen mittels FACScan

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einem GFP (Green Fluorescent Protein) Expressionsplasmid (pEGFP IRES hyg) transfiziert und nach zwei Tagen für die Untersuchung mittels FACScan fixiert.

**Materialien:**

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| FACS-Puffer:               | PBS/5% (v/v) FCS |
| PBS:                       | Biochrom KG      |
| 37%Formaldehyd-<br>lösung: | Merck            |

**Durchführung:**

Die Zellen wurden geerntet, zusammengehörige Ansätze zusammengeführt und nach Zentrifugation in FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, erneut abzentrifugiert und in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 100µl in FACS-Puffer

aufgenommen. Je 100µl eines Ansatzes ( $5 \times 10^5$  Zellen) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 300µl PBS und 22µl Formaldehyd fixiert. Bis zur Messung wurden die Zellen dunkel bei 4°C aufbewahrt. Der Anteil fluoreszierender und somit transfizierter Zellen wurde mit dem FACScan gemessen und mit dem Programm WinMDI Version 2.1 ausgewertet.

### 2.2.2 CAT-ELISA

Zur Bestimmung der Aktivität des Tyrosinase- und MIA-Promotors wurde die Expression des bakteriellen Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)-Gens untersucht, welches als "Reportergen" unter die Kontrolle der zu untersuchenden Promotoren gestellt wurde. Das CAT-Gen besitzt kein eukaryontisches Äquivalent und seine Expression ist deshalb in eukaryontischen Zellen alleine auf die transfizierte DNA zurückzuführen. Die Menge des produzierten CAT-Proteins wurde mittels ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") bestimmt. Dabei bindet das CAT-Protein aus dem Zellysat an gegen CAT gerichtete immobilisierte Antikörper auf dem Boden der CAT-ELISA-Platte. Anschließend werden Digoxigenin-gekoppelte Anti-CAT-Antikörper und in einem weiteren Schritt Anti-Digoxigenin-Antikörperfragmente zugegeben. Diese binden an Digoxigenin und sind an Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe des Substrats für Peroxidase setzt eine Farbreaktion ein, wobei die Menge umgesetzten Substrats proportional zur Menge des CAT-Proteins ist. Die optische Dichte wird photometrisch gemessen.

Der CAT-ELISA wurde 2 Tage nach Transfektion der Zellen (2.1.5) mit 0,5µg/Well des entsprechenden CAT-Reportergenplasmids und 0,5µg/Well eines Referenzplasmids (pCMVβ), welches das β-Galaktosidasegen unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält, durchgeführt.

#### Materialien:

|            |             |
|------------|-------------|
| CAT-ELISA: | Roche       |
| PBS:       | Biochrom KG |

#### Durchführung:

Die Lyse der transfizierten Zellen sowie der ELISA selbst wurden nach Angaben des Herstellers mit folgenden Änderungen durchgeführt:

- Die Zellen wurden vor der Lyse nur zweimal statt dreimal mit PBS gewaschen
- Der CAT-Standard wurde durch einen weiteren Wert ergänzt, die einzelnen Standards wurden in der doppelten Konzentration verglichen mit den Herstellerangaben eingesetzt
- Das Lysat der Positivkontrolle (pCMV CAT) wurde 1:2 mit Lysispuffer verdünnt



eingesetzt

Die photometrische Messung des ELISAs erfolgte bei 405nm (Referenzfilter: 492nm) in einem Anthos-ELISA-Reader.

Die übrig gebliebenen Zell-Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Durchführung des  $\beta$ -Galaktosidase-Tests (als Standardisierung) bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.3 $\beta$ -Galaktosidase-Test

Um Schwankungen durch unterschiedliche Transfektionseffizienz oder Zellzahl bei der Auswertung des CAT-ELISAs (2.2.2) auszugleichen, erhielten alle Transfektionsansätze (2.1.5) neben dem entsprechenden CAT-Expressionsplasmid 0,5 $\mu$ g eines  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsplasmids (pCMV $\beta$ ). Nach der Untersuchung der Zellysate mittels CAT-ELISA wurden die Lysate dann dem  $\beta$ -Galaktosidase-Test unterzogen und bei der Auswertung der Quotient aus dem Ergebnis des CAT-ELISAs und dem Ergebnis des  $\beta$ -Galaktosidase-Tests gebildet.

Beim  $\beta$ -Galaktosidase-Test wird farbloses ONPG (O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) durch das bakterielle Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zum gelben Farbstoff O-Nitrophenol umgesetzt. Dabei ist die Menge des gebildeten Farbstoffs und damit die optische Dichte proportional zur Enzymmenge. Die optische Dichte wird photometrisch gemessen.

#### Materialien:

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Lysis-Puffer:           | aus dem CAT-ELISA Kit (Roche)   |
| Assay 2x Buffer:        | 164mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 36mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (ergibt 200mM Natriumphosphat; pH 7,3), 2mM MgCl <sub>2</sub> , 100mM Mercaptoethanol, 1,33mg/ml ONPG<br>bei -20°C in Portionen gelagert |
| $\beta$ -Galaktosidase: | 1,7mg/ml , 1,19U/ $\mu$ l (Sigma)   |
| Stopplösung:            | 1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  |

#### Durchführung:

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Test wurde in einer 96-Well-Platte mit flachem Boden durchgeführt. Als Standard wurde die  $\beta$ -Galaktosidase zunächst in Lysis-Puffer auf 0, 2, 4, 6, 8 und 10mU pro 50 $\mu$ l verdünnt. Standard und Leerwert (Lysis-Puffer) wurden doppelt bestimmt und der Mittelwert berechnet. Für den Test wurden je 50 $\mu$ l Standard oder Leerwert bzw. 30 $\mu$ l Zellysat plus 20 $\mu$ l Lysispuffer eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 $\mu$ l Assay 2x Buffer gestartet und bei 37°C unter leichtem Schütteln (100UpM) inkubiert, bis sich eine Gelbfärbung der Proben zeigte (etwa 10 bis

30 Minuten). Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 150µl Stopplösung beendet und die optische Dichte im ELISA-Reader bei 405nm gemessen.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden:

### 2.3.1 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

#### Materialien:

|             |  |
|-------------|--|
| LB Medium:  | 5g NaCl; 5g Hefeextrakt; 10g Trypton, 1g Glucose<br>ad 1000ml A.b.<br>autoklaviert |
| Glyzerin:   | 50% (v/v), sterilfiltriert   |
| Ampicillin: | 150mg/ml   |

#### Durchführung:

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklaviertem Material unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Stammhaltung von *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen erfolgte in LB-Glyzerinkulturen. Dabei wurde ein Volumenteil einer exponentiell wachsenden LB-Flüssigkultur mit einem Volumenteil 50%igem sterilen Glyzerin versetzt. Die Kulturen konnten dann bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Anzucht der Bakterien wurde in LB-Medium durchgeführt. Die jeweils angeimpften Medien enthielten zur Selektion 150µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin und wurden bei 37°C auf dem Schüttler (200UpM) inkubiert.

### 2.3.2 Herstellung "kompetenter" Bakterien

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen (Transformation) ist normalerweise kein effizienter Vorgang. Aus diesem Grunde müssen die Zellen zuvor durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  "kompetent", d.h. aufnahmebereit, gemacht werden (Dagert & Ehrlich, 1979).

#### Materialien:

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| $\text{CaCl}_2$ -Puffer: | 50mM $\text{CaCl}_2$ |
| Glyzerin:                | 50% (v/v)            |
| LB-Medium:               |                      |
| <i>E.coli</i> :          | XL2 blue             |

#### Durchführung:

Zur Herstellung der " $\text{Ca}^{2+}$ -Zellen" wurden 2x60ml LB-Flüssigmedium mit je 1,2ml (1:50 Verdünnung) einer Übernachtskultur eines *E.coli* Stammes beimpft und im Schüttelinkubator (200 UpM, 37°C) bis zu einer optischen Dichte  $\text{OD}_{600}$  zwischen 0,5

und 0,6 angezüchtet. Die Bakteriensuspension (2x40ml) wurde 10 Minuten bei 3400 UpM in einem Sorvall ST-H750 bei 4°C zentrifugiert, die Sedimente in je 20ml (50% des Kulturvolumens) eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert, erneut 6 Minuten zentrifugiert und schließlich vorsichtig in je 4ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder portioniert eingefroren. Zum Einfrieren wurden je 500µl kompetente Bakterien mit 250µl sterilem Glycerin (50%) vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden:

### ▪ Arbeiten mit DNA:

#### 2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA (aus *E.coli*) für analytische Zwecke ("Mini-Prep")

##### Materialien:

|                               |                       |
|-------------------------------|-----------------------|
| LB- Medium:                   | s. 2.3.1              |
| Ampicillin bzw.<br>Kanamycin: | 150mg/ml bzw. 50mg/ml |
| QIAprep Spin<br>Miniprep Kit: | Qiagen                |

##### Durchführung:

Je 1ml LB-Medium (mit 150µg Ampicillin bzw. 50µg Kanamycin pro ml) wurden mit je einem über Antibiotikaresistenz vorselektionierten Bakterienklon unter Verwendung von sterilen Pipettenspitzen beimpft. Die Kulturgefäße wurden mit durchlöchernten Deckeln verschlossen und bei 37°C über Nacht in einem Überkopfrötor inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 2.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden in größeren Mengen (2-5mg) erfolgte mit einem DNA-Präparationskit ("QIAfilter Plasmid Midi" oder "Maxi Kit") von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

### 2.4.3 Standardbedingungen zur Fällung von Nukleinsäuren

#### Materialien:

|                          |   |
|--------------------------|---|
| EtOH/NaAcetat<br>(30:1): | 100% Ethanol; 3M Natriumacetat (pH 5,5) |
| Ethanol:                 | 70% (v/v)                               |

#### Durchführung:

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 3 Volumenteilen Ethanol/Natriumacetat-Gemisch versetzt, vorsichtig gemischt und anschließend 20 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 UpM zentrifugiert. Das Präzipitat wurde dann zur Entfernung von Salzresten kurz mit 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Alkohol abgezogen. Das Präzipitat wurde getrocknet und in A.b. oder entsprechendem Puffer gelöst.

### 2.4.4 Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren

Bei größeren DNA-Mengen erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Extinktionsmessung bei 260nm in 1cm Quarzküvetten mit einem Photometer. Nach Chargaff (1955) entspricht eine  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Für die Extinktionsmessung wurde die DNA üblicherweise 1:50 oder 1:100 verdünnt eingesetzt.

Zur Bestimmung der Konzentration kleinerer Mengen DNA wurde der visuelle Vergleich mit Proben bekannter Konzentration nach Agarose-Gelelektrophorese (2.4.6) und anschließender Ethidiumbromidfärbung (2.4.7) herangezogen.

### 2.4.5 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen stellen einen spezifischen Schutz vor Einbau und Expression fremder DNA in Bakterien dar. Durch Erkennen spezifischer Nukleotidsequenzen und darauffolgender endolytischer DNA-Spaltung wird in Bakterien Fremd-DNA inaktiviert. Bakterieneigene DNA ist hierbei durch Modifikation (z.B. Methylierung der Erkennungssequenz) vor der Spaltung geschützt.

Um ein für eine effiziente Restriktion optimales Milieu zu erstellen, wurden, je nach verwendetem Enzym, die vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer oder der universell einsetzbare One-Phor-All-Puffer (Amersham) eingesetzt. Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in A.b. gelösten Proben-DNA Restriktionspuffer in der für das Enzym angegebenen Konzentration und entsprechende Mengen an

Restriktionsenzym (max. 10% des Reaktionsendvolumens = 5% Glycerin-Endkonzentration).

Die Berechnung der benötigten Enzymeinheiten erfolgte in Bezug auf die vom Hersteller angegebene Unit-Definition (1 Unit schneidet 1µg Lambda DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde). Die Inkubation erfolgte ein bis vier Stunden bei für das Enzym angegebener Temperatur (meist 37°C), anschließend wurde die DNA auf einem Agarosegel (2.4.6) aufgetrennt.

#### **2.4.6 DNA-Gelelektrophorese**

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung größerer DNA-Fragmente (150 bp) dienten native Agarosegele. Die Elektrophorese erfolgte in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1-2%(w/v).

##### **Materialien:**

|                   |   |
|-------------------|---|
| Agarose           |   |
| 10x TBE-Puffer:   | 900mM Tris-Base;<br>900mM Borsäure; 3mM EDTA  |
| 10x Probenpuffer: | 10x TBE-Puffer (s.o.); 50% (w/v) Saccharose;<br>1% (w/v) Bromphenolblau; 1% (w/v) Xylencyanol |
| Geltyp:           | Flachbett-Gel   |
| Lauf:             | 0,5-2 Stunden bei 60-120V   |

##### **Durchführung:**

Die entsprechende Menge Agarose wurde unter Aufkochen in 1x TBE-Puffer gelöst und nach kurzzeitigem Abkühlen in die Gelapparatur gegossen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele gefärbt (2.4.7) und die Größe und ggf. die Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration bestimmt.

#### **2.4.7 Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid**

Im Gel fixierte DNA-Fragmente lassen sich durch Ethidiumbromid, eine polyzyklische, planare und chromophore Verbindung, die sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einlagert, anfärben. Bei UV-Anregung (260-350nm) fluoresziert der Interkalator mit einer Wellenlänge von 590nm im rot-orangefarbenem Bereich des sichtbaren Spektrums.

##### **Materialien:**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Ethidiumbromid-<br>Lösung: | 1µg/ml |
|----------------------------|--------|

**Durchführung:**

Zum Färben gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurden die Gele für 15-30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung unter leichtem Schütteln gefärbt. Die angefärbten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Leuchtschirm bei 260 (analytisches Gel) oder 365nm (präparatives Gel) sichtbar gemacht.

#### **2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels "QIAquick Gel Extraction Kit"**

Nach gelektrophoretischer Auftrennung auf einem präparativen Agarose-Gel (2.4.6) wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt (2.4.7) und die unter UV-Licht (365nm) sichtbare DNA-Bande von Interesse ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit einem "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

#### **2.4.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels mehrmaligem Einfrieren und Auftauen**

Nach gelektrophoretischer Auftrennung auf einem präparativen Agarose-Gel (2.4.6) wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt (2.4.7) und die unter UV-Licht (365nm) sichtbare DNA-Bande von Interesse ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte durch mehrmaliges Einfrieren des Agarosestückchens bei -20°C und dem Abnehmen der entstandenen Flüssigkeit nach dem Auftauen. Die Flüssigkeit, welche die DNA enthielt, wurde nach den einzelnen Auftau-Schritten zusammengeführt und nach Standardbedingungen gefällt (2.4.3).

#### **2.4.10 Subklonierung von DNA-Fragmenten**

##### **2.4.10.1 Dephosphorylierung des Vektors**

**Materialien:**

|                |   |
|----------------|---|
| SAP:           | Alkalische Phosphatase aus Shrimps (1U/μl)      |
| 10xSAP-Puffer: | 500mM Tris-HCl, 50mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,5 |

**Durchführung:**

Ein typischer Dephosphorylierungsansatz enthält:

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| 0,5-2μg      | Fragment bzw. linearisiertes Plasmid |
| 1μl          | 10xSAP-Puffer                        |
| 1U           | SAP                                  |
| A.b. ad 10μl |                                      |

Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion für 15 Minuten bei 65°C

inaktiviert und anschließend zur Ligation (2.4.10.3) eingesetzt.

#### 2.4.10.2 Auffüllen 5'-überhängender Enden und Abbau 3'-überhängender Enden

Das durch Subtilisin-Verdau erhaltene Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I verfügt zwar noch über deren 5'→3'-DNA-Polymerase- und 3'→5'-Exonukleaseaktivität, es besitzt aber keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität mehr. Es ist daher für das Auffüllen 5'-überhängender Enden gut geeignet und kann auch für den Abbau 3'-überhängender Enden benutzt werden.

##### Materialien:

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DNA-Polymerase I              |   |
| Klenow Fragment:              | 1 U/μl                                      |
| Desoxyribonukleotide (dNTPs): | Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10mM |
| BSA:                          | Rinder-Serumalbumin, 2mg/ml                 |

##### Durchführung:

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt in möglichst geringem Endvolumen:

|               |  |
|---------------|--|
| meist 15-20μl | inaktivierten Restriktionsansatz (mit 1-5μg DNA) |
| 1μl           | dNTPs, nur bei Auffüllreaktionen                 |
| 0,5μl         | BSA  |
| 1U            | Klenow-Enzym                                     |

Bei Fragmenten, die ein 3'- und ein 5'-überhängendes Ende besitzen, wurde der Reaktionsansatz ohne dNTPs für 1 Stunde inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde das 3'-überhängende Ende aufgrund der 3'→5' Exonukleaseaktivität abgebaut, so daß ein "blunt end" entstand.

Um 5'-überhängende Enden aufzufüllen, wurde der Reaktionsansatz inklusive der dNTPs 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die 5'-überhängenden Enden aufgrund der 5'→3'-DNA-Polymerase-Aktivität aufgefüllt.

Anschließend wurde der Ansatz mittels "QIAquick PCR Purification Kit" nach Angaben des Herstellers von Proteinen, Nukleotiden und Salzen gereinigt und dadurch inaktiviert. Die DNA wurde dann in weiteren Reaktionen (erneute Restriktionsspaltung (2.4.5), Ligation (2.4.10.3)) eingesetzt.

### 2.4.10.3 Ligationsreaktion

**Materialien:**

|                   |  |
|-------------------|--|
| 10x Ligasepuffer: | 300mM Tris-HCl (pH7,8); 100mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>10mM ATP; 100mM DTT |
| T4 DNA-Ligase:    | 3U/μl  |

**Durchführung:**

Ein Reaktionsansatz enthielt üblicherweise:

|              |   |
|--------------|---|
| 50ng         | linearisierte und ggf. dephosphorylierte Vektor-DNA |
| 500ng        | Fragment-DNA ("Insert")                             |
| 1,3μl        | 10x Ligasepuffer                                    |
| 3U           | T4 DNA-Ligase                                       |
| A.b. ad 13μl |   |

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Mit diesem Ansatz wurden nachfolgend "kompetente" *E.coli* Zellen transformiert (2.4.10.4).

### 2.4.10.4 Transformation

**Materialien:**

|                            |  |
|----------------------------|--|
| LB-Medium:                 | s. 2.3.1.  |
| Agarplatten:               | LB-Medium plus 6-7g Agar/500ml,<br>autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 40°C<br>Antibiotikum zugeben (Ampicillin: 150μg/ml;<br>Kanamycin 50μg/ml), Platten gießen, nach dem<br>Abkühlen bei 4°C lagern |
| "kompetente"<br>Bakterien: | <i>E. coli</i> XL2 blue  |

**Durchführung:**

Die bei -80°C gelagerten "kompetenten" Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut. Für einen Transformationsansatz wurden jeweils 200μl der "kompetenten" Zellen mit der Hälfte eines Ligationsansatzes bzw. mit 50-100ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation im Eisbad wurde der Ansatz für 1,5 Minuten auf 42°C erwärmt und anschließend sofort für 2 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Zugabe von 500μl Raumtemperatur-warmem LB-Medium wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion transformierter Bakterien ausplattiert.



#### 2.4.10.5 Selektion positiver Transformanten

Durch die Insertion der zu klonierenden DNA in die Polylinkerregion von z.B. pUC-Vektoren wird das  $\beta$ -Galaktosidasegen inaktiviert (Insertionsinaktivierung der  $\alpha$ -Komplementation). Eine Selektion positiver Transformanten lässt sich somit bezüglich des defekten  $\beta$ -Galaktosidasegens und der Ampicillinresistenz durchführen. Positive Klone sollten auf ampicillinhaltigen Agarplatten mit dem Farbindikator X-Gal (Amp-X-Gal) weiße Kolonien bilden, während Transformanten ohne Insertion durch die funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase beim Abbau des Farbstoffes eine tiefblaue Indigoverbindung bilden.

##### Materialien:

|              |  |
|--------------|--|
| LB-Amp-X-Gal |  |
| Agarplatten: | LB Kulturmedium (s. 2.3.1),<br>1,5% (w/v) Agar; 50mg/l Ampicillin,<br>0,01% (w/w) X-Gal gelöst in Dimethylformamid |

##### Durchführung:

Jeweils 50-200  $\mu$ l Aliquots der Transformationsansätze (2.4.10.4) wurden auf LB-Amp-X-Gal Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle eindeutig positiven (weißen) Transformanten wurden zur weiteren Charakterisierung in den "Mini-Prep" (2.4.1) eingesetzt.

#### 2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methode wurde u.a. zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Subklonierung (2.4.10) und zur Herstellung von Sonden für den Northern Blot (2.4.19) eingesetzt.

##### Materialien:

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| spezifische Primer               |   |
| DNA-Matrize:                     | Plasmid-DNA   |
| Expand High Fidelity Polymerase: | 3,5U/ $\mu$ l, enthalten im Expand High Fidelity PCR System (Roche), enthält Proofreading-Funktion<br>(wurde nur für PCRs zur Subklonierung verwendet!) |
| oder                             |   |
| Taq-Polymerase:                  | 5U/ $\mu$ l (Qiagen)  |
| dNTP-Mix:                        | Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10mM   |
| 10x Puffer:                      | jeweils zur Polymerase zugehörig, mit 15mM $\text{mgCl}_2$  |
| A.b.                             |   |

**Durchführung:**

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt in einem 50µl Ansatz:

|         |                 |
|---------|-----------------|
| 1µM     | ersten Primer   |
| 1µM     | zweiten Primer  |
| 5-10ng  | Plasmid-DNA     |
| 5µl     | 10x Puffer      |
| 1µl     | dNTP-Mix (10mM) |
| 1U      | Polymerase      |
| ad 50µl | A.b.            |

Die PCR lief üblicherweise unter folgenden Bedingungen ab:

|                               |             |      |                  |
|-------------------------------|-------------|------|------------------|
| erster Denaturierungsschritt: | 3 Minuten   | 94°C |                  |
| 30 Zyklen:                    | 30 Sekunden | 94°C | (Denaturierung)  |
|                               | 1 Minute    | 55°C | (Hybridisierung) |
|                               | 1 Minute    | 72°C | (Elongation)     |
| letzter Elongationsschritt:   | 7 Minuten   | 72°C |                  |

Die Hybridisierungstemperatur wurde für die jeweiligen Primer optimiert.

Anschließend wurde zur Präparation der DNA aus dem Gel der gesamte oder zur Überprüfung nur ein Teil des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel (2.4.6) aufgetragen und die DNA durch Ethidiumbromidfärbung (2.4.7) nachgewiesen.

**2.4.12 PCR-"Mini-Prep"**

Die PCR-Methode wurde u.a. dazu eingesetzt, bei der Subklonierung eines DNA-Fragments nach der Transformation (2.4.10.4) eine große Anzahl von Bakterien auf das gewünschte DNA-Fragment hin zu überprüfen.

**Materialien:**

|                     |  |
|---------------------|--|
| spezifische Primer  |  |
| DNA-Matrize:        | Bakterienklon                                  |
| Taq-Polymerase:     | BioTherm, 5U/µl (Gene Craft)                   |
| dNTP-Mix:           | Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP,<br>je 10mM |
| 10x BioTherm Puffer |  |
| A.b.                |  |

**Durchführung:**

Ein einzelner Bakterienklon wurde mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen und gleichzeitig zur späteren Identifizierung auf eine frische, in nummerierte Raster eingeteilte Agarplatte (mit Selektionsantibiotikum) übertragen. Zu dem Bakterienklon, der die Matritzen-DNA

enthielt, wurden die übrigen Reagenzien (als Mix) gegeben.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 25µl:

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| Bakterienklon |                     |
| 1µM           | erster Primer       |
| 1µM           | zweiter Primer      |
| 2,5µl         | 10x BioTherm Puffer |
| 0,5µl         | dNTP-Mix (10mM)     |
| 0,75U         | Polymerase          |
| ad 25µl       | A.b.                |

Die PCR lief üblicherweise unter folgenden Bedingungen ab:

|                               |             |      |                  |
|-------------------------------|-------------|------|------------------|
| erster Denaturierungsschritt: | 7 Minuten   | 94°C |                  |
| 35 Zyklen:                    | 30 Sekunden | 94°C | (Denaturierung)  |
|                               | 1 Minute    | 55°C | (Hybridisierung) |
|                               | 1,5 Minuten | 72°C | (Elongation)     |
| letzter Elongationsschritt:   | 7 Minuten   | 72°C |                  |

Die Hybridisierungstemperatur wurde für die jeweiligen Primer optimiert.

Anschließend wurde zur Überprüfung ein Teil des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel (2.4.6) aufgetragen und die DNA durch Ethidiumbromidfärbung (2.4.7) nachgewiesen. Aus positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA zur weiteren Untersuchung mittels "Mini-Prep" (2.4.1) isoliert und einer Restriktionsanalyse (2.4.5) unterzogen.

### 2.4.13 Abtrennung freier Nukleotide

Um Sonden für den Northern Blot nach der radioaktiven Markierung (2.4.19.2) oder PCR-Ansätze (2.4.11) von freien Nukleotiden (sowie Proteinen und Salzen) zu reinigen, wurde das QIAquick Nucleotide Removal Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

## ▪ Arbeiten mit RNA:

### 2.4.14 Präparation von Gesamt-RNA aus Zelllinien

#### Materialien:

|                  |        |
|------------------|--------|
| RNeasy Mini Kit: | Qiagen |
| QIAshredder:     | Qiagen |

#### Durchführung:

Zur Präparation der Gesamt-RNA mittels "RNeasy Mini Kit" wurden  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt, die als Sediment bei -80°C gelagert waren. Das gefrorene Sediment wurde

in 600µl RLT-Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert und über "QIAshredder"-Säulen homogenisiert. Desweiteren wurde nach Angaben des Herstellers verfahren und die RNA schließlich mit 2x 30µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.15 RNA-Aufarbeitung (DNase-Behandlung)

Um potentielle DNA-Kontaminationen (genomische DNA) bei der isolierten RNA zu entfernen, wurde eine DNase Behandlung durchgeführt.

##### Materialien:

|                          |  |
|--------------------------|--|
| A.b. (DMPC):             | RNase-freies Wasser: A.b., 0,1% (v/v) DMPC, autoklaviert |
| 10x DNase-Testpuffer:    | 1M NaAcetat, 50mM MgSO <sub>4</sub> , pH 5               |
| DNase-Verdünnungspuffer: | 25mM Tris-HCl pH 7,6, 50% (v/v) Glycerin                 |
| DNase I                  | 10U/µl (Roche)   |

##### Durchführung:

Zunächst wurde die DNase 1:10 mit DNase-Verdünnungspuffer verdünnt, um eine Konzentration von 1U/µl zu erhalten.

Ein typischer Reaktionsansatz für die DNase-Behandlung enthielt:

|          |  |
|----------|--|
| RNA:     | aus Präparation mit dem "RNeasy-Mini-Kit" (s.o.) |
| ad. 88µl | A.b. (DMPC)                                      |
| 10µl     | 10x DNase-Testpuffer                             |
| 2µl      | DNase I (1U/µl)                                  |

Dieser Reaktionsansatz wurde 10 Minuten bei 25°C inkubiert, anschließend Phenol-Chloroform-extrahiert und die RNA gefällt (2.4.16).

#### 2.4.16 Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

##### Materialien:

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Roti®-Phenol-Chloroform | Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) (Roth)         |
| Ethanol abs.            |   |
| NaAcetat:               | 3M, für Arbeiten mit RNA mit A.b. (DMPC) angesetzt        |
| Ethanol:                | 70% (v/v), für Arbeiten mit RNA mit A.b. (DMPC) angesetzt |

##### Durchführung:

Um Nukleinsäuren (DNA oder RNA, hier RNA) von Proteinen (hier DNase) zu reinigen, wurde der Ansatz phenolisiert. Hierzu wurde ein Volumenteil Roti®-Phenol-

Chlorophorm zu der RNA-Lösung gegeben, 1 Minute gevortext und anschließend 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 UpM zentrifugiert. Der wässrige, RNA-haltige Überstand wurde abgenommen, mit 2 Volumenteilen Ethanol abs. und 1/10 Volumenteil NaAcetat vermischt und 1 Stunde bei -80°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 30 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol abgezogen, das RNA-Sediment luftgetrocknet und in 50µl A.b. (DMPC) resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA durch Absorptionsmessung einer 1:50-Verdünnung in einem Photometer (2.4.17) bestimmt.

#### **2.4.17 Konzentrationsbestimmungen von RNA**

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion bei 260nm in einer 1cm Quarzküvette in einem Photometer gemessen, wobei eine OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 40µg RNA/ml entspricht.

#### **2.4.18 RNA-Gelelektrophorese**

Die Qualität der unter 2.4.14 isolierten RNA wurde nach DNase-Behandlung (2.4.15) und Konzentrationsbestimmung (2.4.17) in einem 1%igen Agarose/Formaldehyd-Gel zunächst überprüft, um dann eine weitere RNA-Gelelektrophorese für den Northern Blot (2.4.19) durchzuführen.

##### **Materialien:**

|                   |  |
|-------------------|--|
| Agarose           |  |
| 10x MOPS-Puffer:  | 400mM MOPS pH 7,0; 100mM NaAcetat<br>10mM EDTA, pH 7,0   |
| Formaldehyd:      | 37%  |
| A.b.              |  |
| RNA-Probenpuffer: | 2,5ml Formamid (20%), 0,9ml Formaldehyd (37%),<br>0,5ml 10x MOPS, 10µl Etidiumbromid (10mg/ml),<br>0,1% (w/v) Bromphenolblau |
| Geltyp:           | Flachbett-Gel  |
| Lauf:             | 0,5-2 Stunden bei 60-100 V   |

##### **Durchführung:**

Ein 6x10cm großes Gel wurde wie folgt hergestellt:

0,75g Agarose wurden in 37,5ml A.b. aufgekocht, dann 5ml 10x MOPS-Puffer und 30ml A.b. zugegeben. Nach leichtem Abkühlen wurden schließlich 1,35ml Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen.

Die RNA-Proben (2µg RNA zur Qualitätsprüfung, 10µg RNA für Northern Blot) wurden mit DMPC-Wasser auf ein einheitliches Volumen gebracht, mit 2 Volumenteilen RNA-Probenpuffer gemischt und bei 65°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS.

Nach der Gelelektrophorese wurden die RNA-Banden durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Die Qualität der RNA wurde anhand der 18S rRNA- und 28S rRNA-Banden überprüft.

## **2.4.19 Northern Blot**

### **2.4.19.1 Northern Transfer**

Im Northern Blot wurde die differentielle Expression des Tyrosinase- und des MIA-Gens in verschiedenen Zelllinien auf mRNA-Ebene gezeigt.

#### **Materialien:**

A.b. (DMPC)

20x SSC                      3M NaCl, 300mM Na-Citrat-Dihydrat, pH 7,5,  
autoklaviert

10x SSC                      1,5M NaCl, 150mM Na-Citrat-Dihydrat, pH 7,5,  
autoklaviert

Whatman-Papier            Schleicher & Schuell

Nylon-Membran            Boehringer

Papierhandtücher

#### **Durchführung:**

Es wurde 10µg isolierte Gesamt-RNA aus den Zelllinien UKRV-Mel-6a, MeWo, SK-Mel-23, B16 und HeLa verwendet und damit eine RNA-Gelelektrophorese (2.4.18) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz mit DMPC-Wasser gespült und anschließend zweimal 15 Minuten in 10x SSC gewaschen. Anschließend folgte der Blotaufbau in der Elektrophoresekammer, die in beiden Pufferkammern 20x SSC-Puffer enthält. Zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Whatman-Papier, die länger als das Gel zugeschnitten wurden, ragten mit beiden Enden in die Pufferkammern. Darauf wurde das Gel luftblasenfrei aufgelegt, darauf in Gelgöße luftblasenfrei die Nylonmembran, 2 Lagen mit 20x SSC befeuchtetes Whatman-Papier sowie ein etwa 10 cm hoher Stapel Papierhandtücher. Der Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Die Saugspannung zieht die RNA aus dem Gel auf die positiv geladene Nylon-Membran. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran in 2x SSC gespült. Auf einem Transilluminator wurden die Lauffront der 28S rRNA und 18S rRNA

und die Geltaschen sowie die ggf. mitgeführten Markerbanden gekennzeichnet. Die RNA wurde durch UV-Bestrahlung im Crosslinker bei 1200mV auf der Membran fixiert.

#### 2.4.19.2 Radioaktive Markierung von Sonden

Für den Nachweis von MIA mRNA wurde ein über "QIAquick PCR Purification Kit" gereinigtes PCR-Produkt von 413bp verwendet, welches mit dem Primerpaar AP-Mia sense und AP-Mia antisense aus der humanen MIA-cDNA amplifiziert worden war (2.4.11).

Für den Nachweis von Tyrosinase mRNA wurde ein über "QIAquick PCR Purification Kit" gereinigtes PCR-Produkt von 284bp verwendet, welches mit dem Primerpaar Tyr-1 und Tyr-2 aus der humanen Tyrosinase-cDNA amplifiziert worden war (2.4.11).

Für den Nachweis von GAPDH (Glycerin-Aldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase, Haushaltsgen)-mRNA als Indikator der Gesamtmenge aufgetragener RNA wurde ein über "Jet Quick Purification Kit" gereinigtes PCR-Produkt von 638bp verwendet, welches mit dem Primerpaar GAPDH forward und GAPDH reverse aus cDNA amplifiziert worden war und freundlicherweise von Dirk Usener (DKFZ Heidelberg, Abt. D0900) zur Verfügung gestellt wurde.

##### Materialien:

|                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| High Prime Kit:                    | Boehringer  |
| [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP: | 3000Ci/mmol |
| QIAquick Nucleotide Removal Kit:   | Qiagen      |

##### Durchführung:

Zur radioaktiven Markierung wurden jeweils etwa 100ng Sonde eingesetzt.

Die Sonde wurde in einem Volumen von 11 $\mu$ l 10 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

Ein Markierungsansatz wurde auf Eis angesetzt und enthielt:

|            |                                   |
|------------|-----------------------------------|
| 11 $\mu$ l | Sonde (ca. 100ng)                 |
| 4 $\mu$ l  | High Prime Lösung                 |
| 5 $\mu$ l  | [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP |

Die Reaktion wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert und ohne sie zu stoppen mit dem "QIAquick Nucleotide Removal Kit" nach Angaben des Herstellers von freien Nukleotiden gereinigt. Die Sonden wurden mit jeweils 200 $\mu$ l Puffer EB (im Kit enthalten) eluiert und maximal 2 Wochen bei -20°C gelagert.

### 2.4.19.3 Hybridsierung und autoradiographische Detektion

#### Materialien:

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| 50x Denhardt`s<br>Reagenz:  | 0,5g Ficoll Typ 4000, 0,5g Polyvinylpyrrolidon, 0,5g BSA, ad 50ml H <sub>2</sub> O<br><br>sterilfiltriert bei -20 °C gelagert  |
| 30% (w/v)<br>Dextransulfat: | Dextransulfat in 63°C warmem A.b. gelöst   |
| 10% (w/v) SDS:              | 10g SDS, ad 100ml A.b., sterilfiltriert  |
| Hybridisierungs-<br>lösung: | 100ml 30% (w/v) Dextransulfat (final: 10%), 30ml 10% (w/v) SDS (final: 1%), 45ml 20x SSC (final: 3x), 60ml 50x Denhardt`s Reagenz (final: 10x), 65ml A.b. (steril)<br><br>portioniert bei -20°C gelagert |
| Lachssperm DNA-<br>Lösung:  | 10mg/ml (Gibco BRL)  |
| 2x SSC:                     | 10% (v/v) 20x SSC  |
| 2x SSC/0,1% SDS:            | 10% 20x SSC, 1% (v/v) SDS (10%)  |
| 0,2x SSC/0,1% SDS:          | 1% (v/v) 20x SSC, 1% (v/v) SDS (10%)   |

#### Durchführung:

Als Positivkontrolle wurden etwa 40ng unmarkierte, frisch denaturierte Sonde auf ein Stückchen Nylon-Membran getropft, durch UV-Licht im Crosslinker bei 1200mV fixiert und mit dem Blot hybridisiert.

#### Prähybridisierung:

15-20ml Hybridisierungslösung wurden im Wasserbad auf 55°C (für die Tyrosinase- und MIA-Sonde) bzw. 60°C (für die GAPDH-Sonde) erwärmt. Die Lachssperm DNA-Lösung wurde 10 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in einer Endkonzentration von 0,1mg/ml zur Hybridisierungslösung gegeben. Darin wurde die geblottete Nylon-Membran 2 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert.

#### Hybridisierung:

Die radioaktiv markierte Sonde wurde 10 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in den Prähybridisierungs-Ansatz gegeben. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 55°C (für Tyrosinase- und MIA-Sonde) bzw. 60°C (für GAPDH-Sonde) unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde die gebrauchte Hybridisierungslösung inklusive Sonde bei -20 gelagert und konnte nach erneutem Denaturieren nochmals verwendet werden, solange die Radioaktivität nicht zu stark abgeklungen war.



Waschen:

Die Membran wurde kurz mit 2x SSC gespült, dann zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde zweimal 15 Minuten mit 2x SSC/0,1% SDS bei 42°C und anschließend zweimal 30 Minuten mit 0,2x SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Radioaktivität der Membran gemessen und ggf. kürzer oder länger gewaschen.

Autoradiographie:

Die Membran wurde feucht eingeschweißt, mit der RNA-Seite nach oben in einer Röntgenfilmkassette fixiert und ein Röntgenfilm sowie eine Verstärkerfolie ("Intensifying Screen") aufgelegt. Der Röntgenfilm lag zwischen vier Stunden und mehreren Tagen bei -80°C auf und wurde anschließend im Entwickler AGFA CURIX 60 entwickelt.

**2.4.19.4 Entfernung der Sonde ("Stripping")**

Um die Membran zu lagern oder mit einer anderen Sonde erneut zu hybridisieren, wurde die gebundene Sonde durch "Stripping" der Membran entfernt.

**Materialien:**

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Mild Stripping<br>Solution: | 5mM Tris HCl, pH 8, 2mM EDTA, pH 8,<br>0,1x Denhardt's Lösung |
| 2x SSC:                     | 10% (v/v) 20x SSC   |

**Durchführung:**

Die Sonde wurde durch Inkubation der Nylon-Membran in Mild Stripping Solution für 2 Stunden bei 65°C entfernt, die Membran anschließend kurz mit 2x SSC gespült. Danach wurde entweder eine erneute Hybridisierung durchgeführt oder die Membran feucht eingeschweißt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### 3 ERGEBNISSE

Um in Plasmiden zur "Suizidgentherapie" des malignen Melanoms die Expression von Suizidgenen auf Melanomzellen zu beschränken, sollen diese Gene unter die Kontrolle zelltypspezifischer genregulatorischer Elemente (Promotoren und Enhancer) gestellt werden. Dazu eignen sich Promotoren und Enhancer aus bevorzugt in Melanomzellen oder Melanozyten exprimierten Genen. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden die genregulatorischen Elemente des murinen Tyrosinase- und des humanen MIA-Gens ausgewählt.

Die Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melanogenese und seine Expression ist deshalb auf Melanin produzierende Zellen (Melanozyten, Pigmentzellen der Retina und Melanomzellen) beschränkt. MIA ("Melanoma Inhibitory Activity") wird von Melanomzellen sowie einigen anderen malignen Zellen und Chondrozyten exprimiert. Diese hohe Spezifität der Expression beider Proteine in wenigen Zellarten wird von ihren Promotoren kontrolliert.

Zunächst sollte die Aktivität des Tyrosinase- und des MIA-Promotors in Melanomzelllinien und einer Kontrollzelllinie untersucht werden. Desweiteren wurde der Promotor des Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinasegens (HSVtk-Promotor) als unspezifischer Promotor in die Untersuchungen mit einbezogen, da die Möglichkeit einer selektiven Aktivierung in Melanomzellen durch die Kombination mit melanozytenspezifischen Promotor- und Enhancerelementen getestet werden sollte.

Die Aktivität des Tyrosinase-, MIA- und HSVtk-Promotors sollte anschließend durch pigmentzellspezifische Enhancerelemente selektiv in Melanomzellen erhöht werden, um eine effiziente Expression der Suizidgene zu gewährleisten.

Als Suizidgene wurden die A-Kette des Diphtherietoxingens und die für die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase kodierende Sequenz verwendet. Beide Suizidgene wurden in verschiedenen Melanomzelllinien und einer Kontrollzelllinie unter der Kontrolle der zuvor entwickelten Promotor/Enhancer-Kombinationen getestet und ihre Effektivität in der selektiven Abtötung von Melanomzellen ermittelt.

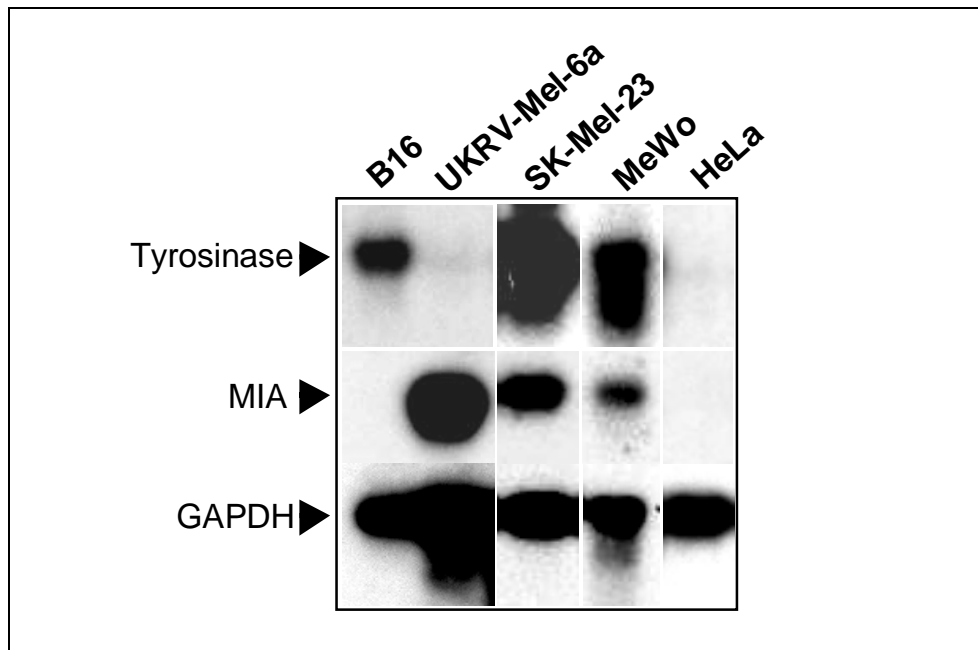
### **3.1 Untersuchung der Spezifität des Tyrosinase- und des MIA-Promotors**

Die selektive Expression von Tyrosinase und MIA in Melanomzellen ist die Voraussetzung für die Verwendung des Tyrosinase- und des MIA-Promotors zur Regulation der Suizidgen-Expression für die Gentherapie des Melanoms.

Deshalb wurde zunächst die endogene Expression von Tyrosinase- und MIA-mRNA in verschiedenen Melanomzelllinien und der Kontrollzelllinie HeLa mittels Northern Blot überprüft und anschließend wurden die regulatorischen Elemente des Tyrosinase- und des MIA-Gens (Promotoren und Enhancer) in *in vitro* Transfektionsexperimenten auf ihre selektive Aktivität in Melanomzellen hin getestet.

#### **3.1.1 Überprüfung der endogenen Tyrosinase- und MIA-Expression in verschiedenen Melanomzelllinien und HeLa mittels Northern Blot**

Zur Überprüfung der endogenen Tyrosinase- und MIA-Expression wurde die Gesamt-RNA aus den Melanomzelllinien UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23, MeWo und B16 sowie der Cervixkarzinomzelllinie HeLa präpariert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. Die Tyrosinase- und MIA-mRNA wurde durch Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden detektiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur Kontrolle der aufgetragenen Gesamt-RNA-Menge wurde die GAPDH-mRNA detektiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1: Northern Blot-Analyse zum Nachweis der Tyrosinase- und MIA-mRNA.** Die mRNA wurde mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  markierten Sonden aus der humanen Tyrosinase- und MIA-cDNA in den Zelllinien B16, UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23, MeWo und HeLa detektiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH mit einer  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  markierten Sonde aus der humanen GAPDH-cDNA detektiert.

In allen getesteten Melanomzelllinien ist Tyrosinase mRNA nachweisbar, in UKRV-Mel-6a jedoch nur sehr schwach (in Abb. 3.1 kaum sichtbar). MIA mRNA findet sich in allen Melanomzelllinien außer B16. Wie zu erwarten war, ist weder Tyrosinase noch MIA-mRNA in den nicht-melanozytären HeLa-Zellen detektierbar, da es sich um gewebespezifisch exprimierte Gene handelt. Diese bevorzugte Expression von Tyrosinase und MIA in den Melanomzelllinien stellt die Voraussetzung für die Verwendung ihrer genregulatorischen Elemente in der gezielten "Suizidgentherapie" von Melanomen dar.

### 3.1.2 Untersuchung der Aktivität und Spezifität der genregulatorischen Sequenzen des Tyrosinase- und MIA-Gens sowie des HSVtk-Gens

Um die Promotoren des Tyrosinase und des MIA-Gens zur zelltypspezifischen Expression therapeutischer Gene nutzen zu können, wurden sie im Vergleich zum unspezifischen HSVtk-Promotor in *in vitro* Transfektionsexperimenten mittels Reportergen-Expression untersucht. Es wurden Plasmide hergestellt, die das Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Reportergen unter der Kontrolle des murinen Tyrosinase- bzw. des humanen MIA-Promotors enthalten.

Desweiteren wurde die Expression des CAT-Gens untersucht, wenn sie vom MIA Promotor und dem HSVtk-Promotor gleichzeitig oder nur vom HSVtk-Promotor kontrolliert wird.

### 3.1.2.1 Herstellung der Promotorkonstrukte

Die Promotorregionen der im folgenden beschriebenen Plasmide sind in Abb. 3.2 schematisch dargestellt.

#### pTyr<sub>1</sub>CAT und pCAT-MIA-1386:

Das Plasmid pTyr<sub>1</sub>CAT (Artuc et al., 1995), welches 270bp des murinen Tyrosinasepromotors bis zum Nukleotid +9 stromaufwärts des CAT-Reportergens enthält, und pCAT-MIA-1386 (Bosserhoff et al., 1996), welches 1386bp des humanen MIA-Promotors bis Nukleotid +70 stromaufwärts des HSVtk-Promotors (169bp) und des CAT-Reportergens enthält, lagen zu Beginn der Untersuchungen vor.

#### pTK CAT:

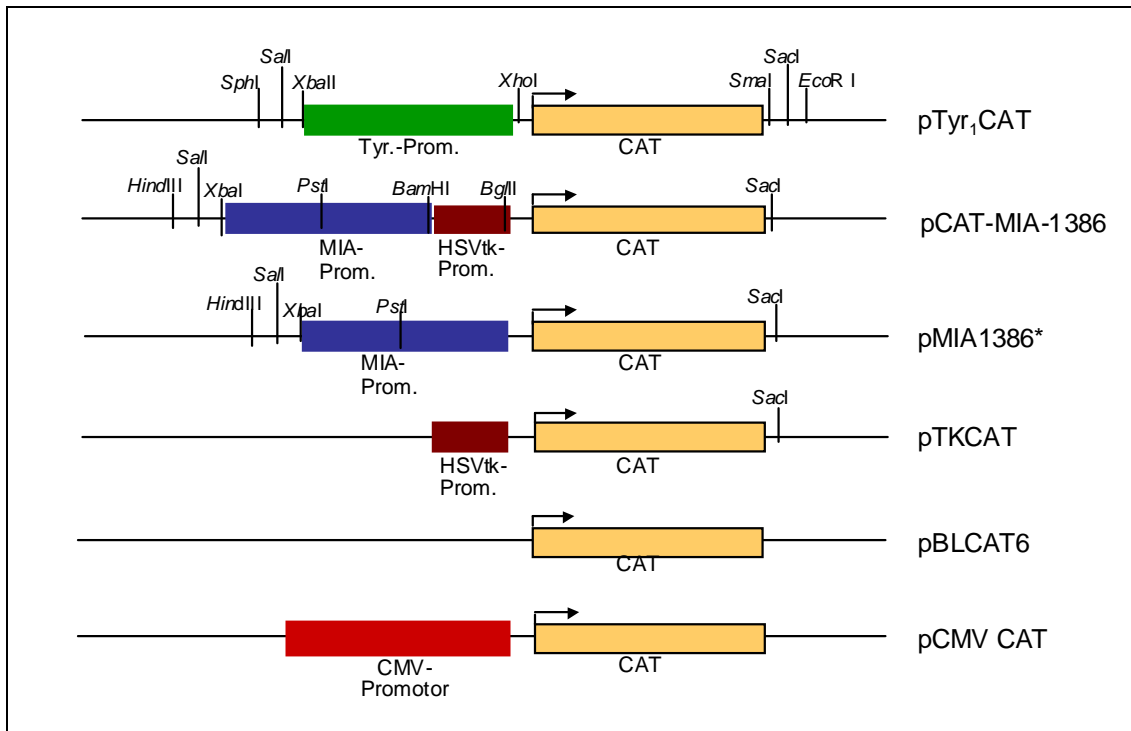
Das Plasmid zur Untersuchung des HSVtk-Promotors (pTK CAT) wurde durch Herausschneiden des MIA-Promotors an den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I, Auffüllen der entstandenen 5'-überhängenden Enden und Religation aus dem Plasmid pCAT-MIA-1386 hergestellt.

#### pMIA1386\*:

Durch Herausschneiden des HSVtk-Promotors aus pCAT-MIA-1386 über die *Bam*HI und *Bgl*II Schnittstellen erhielt man das Plasmid zur Untersuchung der Aktivität des MIA-Promotors (pMIA1386\*).

#### Kontrollplasmide:

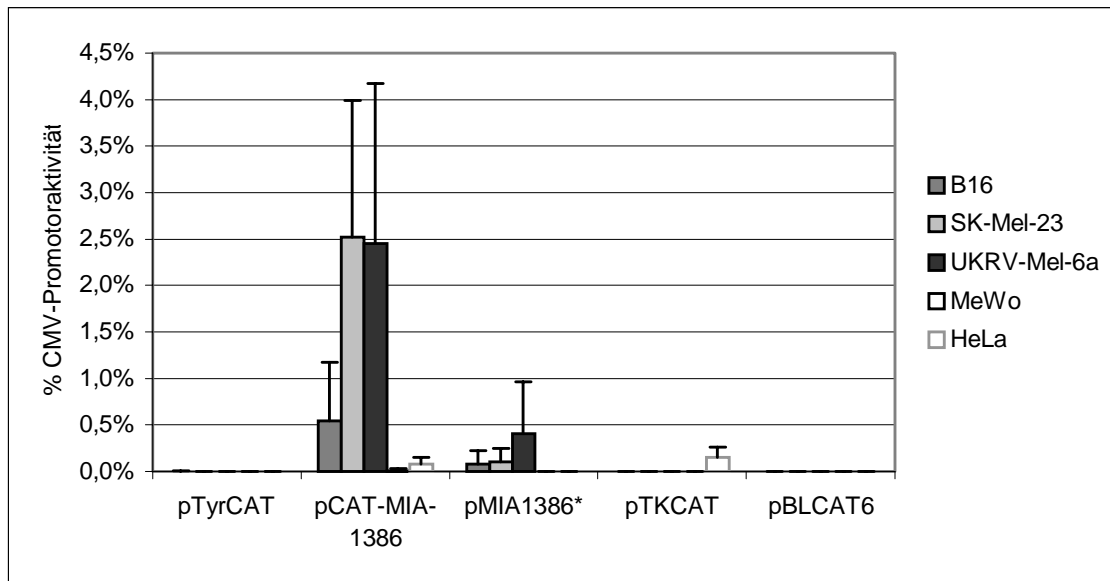
Als Positivkontrolle und Referenz wurde die Aktivität des CMV (Cytomegalievirus)-Promotors im Plasmid pCMV CAT herangezogen, als Negativkontrolle diente das Plasmid pBLCAT6, welches keinen eukaryontischen Promotor enthält.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte.** Der dargestellte Bereich umfaßt jeweils das CAT-Reportergen sowie den stromaufwärts angeordneten Promotor (Tyrosinase-, MIA-, MIA/HSVtk- und HSVtk-Promotor). Die einzelnen Abschnitte sind nicht in ihren tatsächlichen Größenverhältnissen abgebildet. Nur die relevanten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt.

### 3.1.2.2 Untersuchung der Aktivität und Spezifität des Tyrosinase-, MIA- und HSVtk-Promotors im Vergleich zum CMV-Promotor

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurden die Melanomzelllinien UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23, MeWo und B16 sowie die Cervixkarzinomzelllinie HeLa mit den in Abb. 3.2 dargestellten CAT-Expressionsplasmiden pTyr<sub>1</sub>CAT, pCAT-MIA-1386, pMIA1386\* und pTKCAT sowie pCMVCAT transfiziert und anschließend wurde zur Bestimmung der Menge des gebildeten CAT-Proteins als Maß für die Promotoraktivität ein CAT-ELISA durchgeführt. Der Vergleich der Promotoraktivitäten von Tyrosinase-, MIA-, HSVtk- sowie der Fusion aus MIA- und HSVtk-Promotor ist in Abb. 3.3 dargestellt.



**Abb. 3.3: Aktivität des Tyrosinase-, MIA/HSVtk-, MIA- und HSVtk-Promotors.** Die Promotoraktivität wurde in den Zelllinien B16, SK-Mel-23, UKRV-Mel-6a, MeWo und HeLa im Verhältnis zum CMV-Promotor untersucht. Dargestellt sind die durch  $\beta$ -Galaktosidase-Tests standardisierten Mittelwerte der CAT-ELISA-Auswertungen aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt) mit Standardabweichung. Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, am folgenden Tag transfiziert und weitere zwei Tage später die Menge exprimierten CAT-Proteins mittels ELISA bestimmt. Die Aktivität des CMV-Promotors wurde auf 100% festgelegt.

Die Aktivität des Tyrosinasepromotors führt in keiner der getesteten Zelllinien zu nachweisbarem CAT-Protein. Der MIA-Promotor zeigt nur in den Zelllinien B16, SK-Mel-23 und UKRV-Mel-6a schwache Aktivität, die jedoch unter 0,5% der CMV-Promotoraktivität liegt und somit möglicherweise für eine effektive Suizidgen-Expression zu schwach ist. Eine niedrige Aktivität des unspezifischen HSVtk-Promotors ist nur in HeLa (0,15% CMV-Promotoraktivität), nicht aber in Melanomzellen nachweisbar. Die Kombination aus MIA- und HSVtk-Promotor führt zu einem Anstieg der Promotorstärke auf etwa 2,5% CMV-Promotoraktivität in SK-Mel-23 und UKRV-Mel-6a bzw. auf etwa 0,5% CMV-Promotoraktivität in B16. Allerdings ist auch leichte Aktivität in HeLa Zellen zu erkennen, was vermutlich auf den unspezifischen HSVtk-Promotor zurückzuführen ist.

Anmerkung zur Auswertung der Reportergenuntersuchungen: Die scheinbar unterschiedliche Aktivität eines Promotors innerhalb verschiedener Zelllinien kann auch auf unterschiedliche Aktivität des CMV-Promotors in den einzelnen Zelllinien zurückzuführen sein, da bei der Auswertung alle Promotoraktivitäten

auf den CMV-Promotor bezogen wurden.

### **3.2 Steigerung der Promotoraktivität durch Enhancerelemente**

Um eine spätere effiziente Suizidgenexpression zu gewährleisten, sollte die Transkriptionseffizienz der Promotoren gesteigert werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob durch Kombination des HSVtk-Promotors mit melanozytenspezifischen Enhancerelementen eine selektive Aktivitätssteigerung in Melanomzellen erreicht werden kann.

Zunächst wurden mehrere Kopien des murinen Tyrosinase-Enhancerelements stromaufwärts des Tyrosinase-, MIA-, HSVtk- und MIA/HSVtk-Promotors kloniert und die Aktivität der Plasmide in verschiedenen Melanomzelllinien und einer Kontrollzelllinie untersucht. Desweiteren wurden Plasmide mit mehreren Kopien des "Tyrosinase-Distal-Element" (TDE; Yasumoto et al., 1994), eines Enhancerelements aus dem humanen Tyrosinasepromotor, hergestellt und die Wirkung der TDE-Sequenzen auf die Promotoraktivität anhand der CAT-Expression in mehreren Zelllinien untersucht.

#### **3.2.1 Steigerung der Promotoraktivität durch murine Tyrosinase-Enhancer**

Um die Promotoraktivität der zelltypspezifischen Promotoren zu erhöhen und möglicherweise eine spezifische Aktivierung des HSVtk-Promotors in Melanomzellen zu erreichen, wurden mehrere Kopien eines melanozytenspezifischen Enhancerelements mit den Promotoren fusioniert. Ganss et al. (1994a) konnten zeigen, daß dieses melanozytenspezifische Enhancerelement (200bp) aus einer Region 12kb stromaufwärts des murinen Tyrosinasegens eine starke Erhöhung der Tyrosinasepromotoraktivität bewirkt.

##### **3.2.1.1 Herstellung der Enhancerkonstrukte**

Die nachfolgend beschriebenen Enhancerkonstrukte sind schematisch in Abb. 3.4 dargestellt.

##### Klonierung der Enhancer in pTyr<sub>1</sub>CAT:

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung der Enhancerelemente stromaufwärts



des Tyrosinasepromotors diene pTyr<sub>1</sub>CAT. Das Enhancerelement wurde durch PCR mit den Primern AP-Tyr1 und AP-Tyr2 amplifiziert und dadurch am 5'-Ende eine *SphI*- und eine *SalI*-Schnittstelle sowie am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Das *SphI* / *XhoI* geschnittene Enhancerfragment wurde in das *SphI* / *SalI* geöffnete pTyr<sub>1</sub>CAT Plasmid stromaufwärts des Tyrosinasepromotors eingefügt und das entstandene Plasmid als pTyr I bezeichnet. Zur Herstellung der Plasmide pTyr II, pTyr III und pTyr IV mit zwei, drei bzw. vier Enhancern wurden die fusionierten Enhancerfragmente aus den entsprechenden MIA/HSVtk-Promotorkonstrukten (pMIA II, pMIA III bzw. pMIA IV, s.u.) *SalI* / *XbaI* herausgeschnitten und zwischen die *SalI* und *XbaI*-Schnittstellen von pTyr<sub>1</sub>CAT gesetzt. Die Enhancersequenz wurde mittels Sequenzierung überprüft.

#### Klonierung der Enhancer in pCAT-MIA-1386:

Der murine Tyrosinase-Enhancer wurde mit den Primern AP-TYR-1-2 und AP-Tyr2 mittels PCR aus dem Plasmid phsTyr(0,2)CAT (Ganss et al., 1994a) amplifiziert. Durch den 5'-Primer wurde eine *HindIII* und eine *SalI*-Schnittstelle, durch den 3'-Primer eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Das Enhancer-Fragment wurde *HindIII* / *XhoI* geschnitten und zwischen die *HindIII* und *SalI*-Schnittstellen stromaufwärts des MIA/HSVtk-Promotors in das Plasmid pCAT-MIA-1386 eingefügt und die Sequenz mittels Sequenzierung überprüft. Das resultierende Plasmid wurde als pMIA I bezeichnet. Bis zu vier weitere Enhancer wurden auf diese Weise eingefügt und die Plasmide erhielten mit steigender Zahl der Enhancer die Bezeichnung pMIA II, pMIA III, pMIA IV und pMIA V.

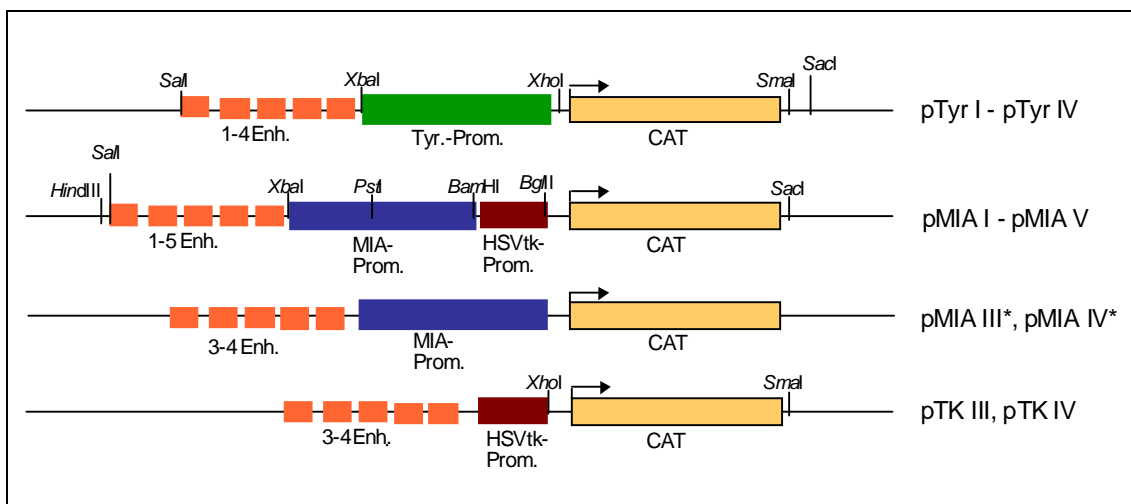
#### Klonierung der Enhancer in pMIA1386\*:

Es wurden MIA-Promotorkonstrukte mit drei und vier murinen Tyrosinase-Enhancern hergestellt. Dazu wurde der HSVtk-Promotor aus den MIA/HSVtk-Promotorkonstrukten mit drei bzw. vier Enhancern (pMIA III bzw. pMIA IV) unter Verwendung der Restriktionsenzyme *BamHI* und *BglII* herausgeschnitten und die Plasmide religiert. Die entstandenen Plasmide erhielten die Bezeichnung pMIA III\* bzw. pMIA IV\*.

### Klonierung der Enhancer in pTK CAT:

Zur Herstellung der Konstrukte mit drei und vier Tyrosinase-Enhancern stromaufwärts des HSVtk-Promotors wurden die MIA/HSVtk-Promotor-Plasmide pMIA III bzw. pMIA IV) *Xba*I / *Bam*HI geschnitten, dadurch der MIA-Promotor herausgeschnitten und die entstandenen Plasmide (pTK III, pTK IV) nach dem Auffüllen der Schnittstellen religiert.

Alle Plasmide, die ein mittels PCR hergestelltes DNA-Fragment enthalten, wurden zur Überprüfung der klonierten Sequenz in diesem Bereich sequenziert.



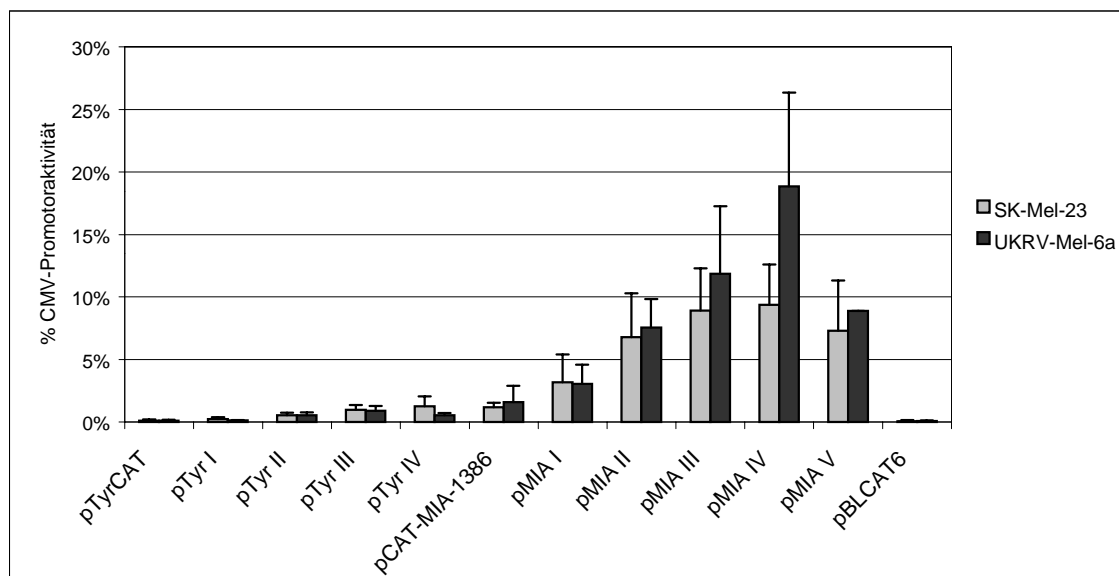
**Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Enhancerkonstrukte.** Der dargestellte Bereich umfaßt jeweils das CAT-Reportergen sowie den stromaufwärts angeordneten Promotor- (Tyrosinase-, MIA-, MIA/HSVtk- und HSVtk-Promotor) und die Enhancerelemente. Die einzelnen Abschnitte sind nicht in ihren tatsächlichen Größenverhältnissen abgebildet. Nur die relevanten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt.

#### **3.2.1.2 Untersuchung des Einflusses der Enhancer auf Promotoraktivität und -spezifität**

Zunächst wurde die Wirkung von ein bis vier Enhancerelementen auf die Aktivität des Tyrosinasepromotors und die Wirkung von ein bis fünf Enhancern auf die Aktivität des MIA/HSVtk-Fusionspromotors in den Melanomzelllinien SK-Mel-23 und UKRV-Mel-6a untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide transfiziert und das Ergebnis durch einen CAT-ELISA ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.5 dargestellt.

Durch die Fusion mit den Enhancerelementen läßt sich in Abhängigkeit von

deren Anzahl sowohl die Tyrosinase- als auch die MIA/HSVtk-Promotoraktivität deutlich steigern. Durch einem Enhancer wird in SK-Mel-23 die Aktivität des Tyrosinasepromotors um das 3-fache, in UKRV-Mel-6a jedoch kaum gesteigert, während zwei Enhancer eine Erhöhung der Tyrosinasepromotoraktivität um das 6-fache in beiden Zelllinien bewirken. Das Maximum der Aktivität des Tyrosinasepromotors wird durch die Kombination mit vier Enhancern in SK-Mel-23 bzw. drei Enhancern in UKRV-Mel-6a (1,3% bzw. 0,9% CMV-Promotoraktivität) erzielt. Die Promotoraktivität konnte damit in SK-Mel-23 um das 14-fache, in UKRV-Mel-6a um das 9-fache erhöht werden. Im Fall des MIA/HSVtk-Promotors bewirkt die Fusion mit vier Enhancern bei beiden Zelllinien die maximale Aktivitätssteigerung auf 9,4% (SK-Mel-23) bzw. 18,9% (UKRV-Mel-6a) des CMV-Promotors. Dies entspricht einer 8-fachen bzw. 12-fachen Aktivitätssteigerung im Vergleich zum MIA/HSVtk-Promotor ohne Enhancer. Die Fusion mit einem fünften Enhancerelement führt zu keiner weiteren Erhöhung der Promotoraktivität, sondern zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität verglichen mit dem Konstrukt mit vier Enhancern.



**Abb. 3.5: Steigerung der Aktivität des Tyrosinase- und MIA/HSVtk-Promotors durch murine Tyrosinase-Enhancerelemente.** Dargestellt sind die durch  $\beta$ -Galaktosidase-Tests standardisierten Mittelwerte der CAT-ELISA-Auswertung aus vier (SK-Mel-23) bzw. zwei bis vier (UKRV-Mel-6a) unabhängigen Experimenten (jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt) mit Standardabweichung. Bei dem Wert für pMIA V bei UKRV-Mel-6a handelt es sich um einen Einzelwert. Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, am folgenden Tag transfiziert und weitere zwei Tage später die Menge exprimierten CAT-Proteins mittels ELISA bestimmt. Die Aktivität des CMV-Promotor wurde auf 100% festgelegt.

In weiteren Untersuchungen wurden nur noch die Konstrukte mit drei und vier Enhancerelementen als stärkste Promotorkonstrukte eingesetzt und mit den Promotoren ohne Enhancer verglichen. Der Vergleich der Promotoraktivität der entsprechenden Konstrukte aus Tyrosinase-, MIA, MIA/HSVtk- und TK-Promotor ist in Abb. 3.6 dargestellt.

Die Promotoraktivität wurde durch Transfektion der Melanomzelllinien SK-Mel-23, UKRV-Mel-6a, B16 und MeWo sowie der Kontrollzelllinie HeLa und anschließende Auswertung mittels CAT-ELISA ermittelt.

Alle untersuchten Promotoren lassen sich nur in den Melanomzelllinien in ihrer Aktivität durch Fusion mit den Enhancerelementen steigern. Hierbei gilt für alle getesteten Melanomzellen, daß der HSVtk-Promotor in Kombination mit den Enhancern die höchsten Aktivitäten zeigt, wobei es von der Zelllinie abhängt, ob mit drei oder vier Enhancern der maximale Wert erreicht wird. Die schwächsten Aktivitäten zeigen der Tyrosinase und der MIA-Promotor, wobei aber auch hier eine Steigerung durch die Enhancer erreicht wird. Es ergeben sich folgende Werte für die einzelnen Zelllinien:

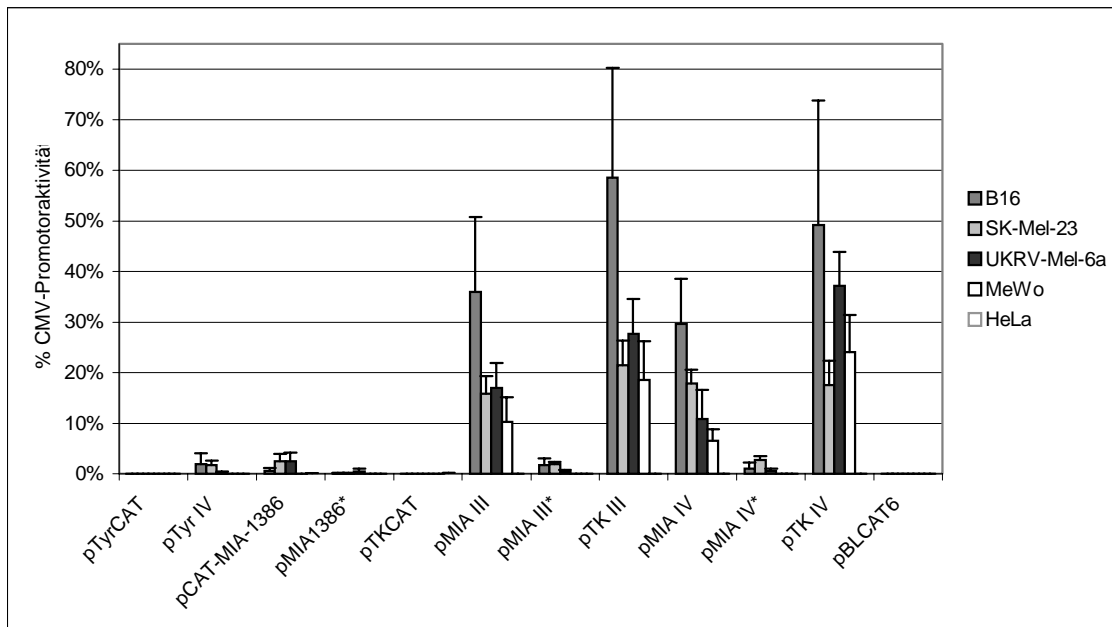
B16: Die Enhancer ergeben beim Tyrosinase- und MIA-Promotor eine Steigerung von nahezu 0% auf etwa 2% (pTyr IV; pMIA III) der CMV-Promotoraktivität, beim MIA/HSVtk-Promotor auf 36% (pMIA III) und beim TK-Promotor auf fast 60% (pTK III) der CMV-Promotoraktivität, wobei jeweils die Konstrukte mit drei Enhancern maximale Steigerung ergeben.

SK-Mel-23: Bei dieser Zelllinie erreichen die CAT-Werte mit Enhancern etwa 2% (pTyr IV) bzw. 3% (pMIA IV\*) CMV-Promotoraktivität mit dem Tyrosinase- bzw. MIA-Promotor, was eine 28-fache Steigerung der MIA-Promotoraktivität durch die Enhancer bedeutet. Die Aktivität des MIA/HSVtk- bzw. HSVtk-Promotors läßt sich auf bis zu 18% (pMIA IV) bzw. 21% (pTK III) steigern. Hier erzielt einmal das Konstrukt mit drei Enhancern (pTK III) und zweimal das Konstrukt mit vier Enhancern (pMIA IV und pMIA IV\*) die beste Aktivität.

UKRV-Mel-6a: Hier erreichen die Tyrosinase- und MIA-Plasmide mit vier bzw. drei Enhancern nur etwa 1% (pTyr IV, pMIA III\*), die MIA/HSVtk und TK-Konstrukte mit drei bzw. vier Enhancern die Höchstwerte von 17% (pMIA III) bzw 37% (pTK IV) CMV-Promotoraktivität.

**MeWo:** In dieser Zelllinie kann auch nach Fusion des Tyrosinase- und MIA-Promotors mit den Enhancerelementen kaum CAT-Protein nachgewiesen werden. Allerdings kann die Aktivität des MIA/HSVtk- und des TK-Promotors mit drei bzw. vier Enhancern auf 10 (pMIA III) bzw. 24% (pTK IV) CMV-Promotoraktivität angehoben werden.

**HeLa:** Alle Enhancer-Konstrukte sind in HeLa nicht nachweisbar aktiv. Die minimalen Aktivität des TK-Promotors von 0,15% CMV-Promotoraktivität (pTK CAT) und des MIA/HSVtk-Promotors von 0,08% (pCAT-MIA-1386, siehe Abb. 3.3) ist nach Fusion mit den melanozytenspezifischen Enhancerelementen nicht mehr detektierbar.



**Abb. 3.6: Selektive Steigerung der Promotoraktivität in Melanomzellen durch Fusion mit murinen Tyrosinase-Enhancerelementen.** Untersucht wurden die Enhancerkonstrukte mit dem Tyrosinase-, MIA/HSVtk-, MIA- und HSVtk-Promotor. Dargestellt sind die durch  $\beta$ -Galaktosidase-Tests standardisierten Mittelwerte der CAT-ELISA-Auswertungen aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt) mit Standardabweichung. Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, am folgenden Tag transfiziert und weitere zwei Tage später die Menge exprimierten CAT-Proteins mittels ELISA bestimmt. Die Aktivität des CMV-Promotors wurde auf 100% festgelegt.

Drei bzw. vier Kopien des Tyrosinase-Enhancerelements vermögen die Aktivität der zuvor sehr schwachen Promotoren deutlich zu steigern und führen sogar zu einer selektiven Aktivität des HSVtk-Promotors in den Melanomzelllinien, nicht jedoch in HeLa. Dies stellt die Voraussetzung für eine Anwendung der

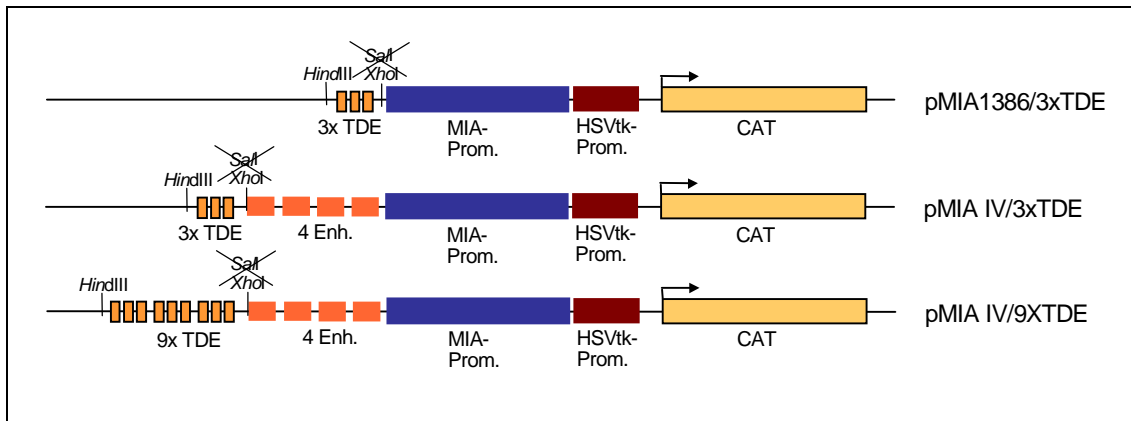
Promotoren in Verbindung mit "Suizidgenen" zur selektiven Abtötung von Melanomzellen dar.

### **3.2.2 TDE-Enhancer bewirken keine weitere Steigerung der Promotoraktivität der MIA/HSVtk-Promotorkonstrukte**

TDE, das "Tyrosinase Distal Element" aus dem humanen Tyrosinasepromotor (Nukleotide -1861 bis -1842), wurde von Yasumoto et al. (1994) als pigmentzellspezifischer Enhancer beschrieben. Um die zelltypspezifische Promotoraktivität im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung möglicherweise weiter zu optimieren, wurden CAT-Expressionsplasmide mit dem MIA/HSVtk-Promotor und dem TDE-Enhancer hergestellt und in Transfektionsexperimenten auf ihre CAT-Expression als Maß für die Promotorstärke hin untersucht.

#### **3.2.2.1 Herstellung der TDE-Konstrukte**

Die TDE-Enhancer lagen in dreifacher und neunfacher Kopie in den Plasmiden pGL3-3xTDE-SV40P und pGL3-9xTDE-SV40P vor (S. Hemmi, Institut für Molekularbiologie Zürich). Es wurden Konstrukte ausgehend vom Plasmid pCAT-MIA-1386 mit drei Kopien des TDE und ausgehend vom Plasmid pMIA IV mit drei und neun Kopien des TDE hergestellt. Dazu wurden die Fusionen bestehend aus drei bzw. neun TDE-Kopien zunächst mit Hilfe der *Xho*I- und *Kpn*I-Schnittstelle aus dem Plasmid pGL3-3xTDE-SV40P bzw. pGL3-9xTDE-SV40P herausgeschnitten und in den Vektor pGEM-7Zf(+/-) umkloniert. Dann wurden die 3-fach bzw. 9-fach TDE-Enhancer über die *Xho*I- und *Hind*III-Schnittstellen aus pGEM-7Zf(+/-) wieder herausgeschnitten und in pCAT-MIA-1386 stromaufwärts des MIA/HSVtk-Promotors und in pMIA IV stromaufwärts der murinen Tyrosinase-Enhancer zwischen die *Sal*I- und *Hind*III-Schnittstelle eingefügt. Die resultierenden Plasmide wurden pMIA1386/3xTDE, pMIA IV/3xTDE und pMIA IV/9xTDE genannt und sind in Abb. 3.7 schematisch dargestellt.

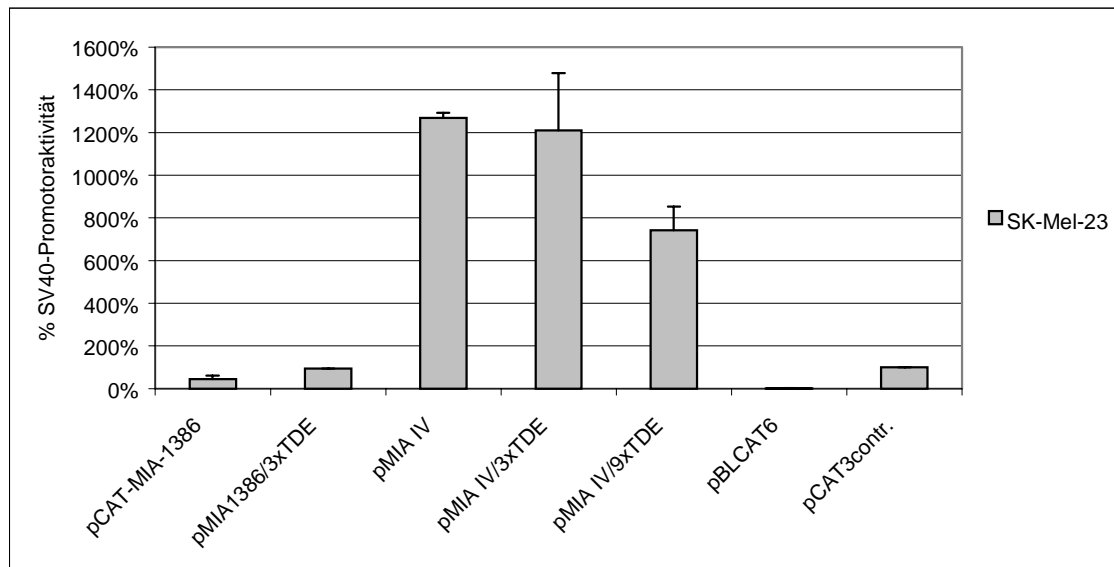


**Abb. 3.7: Schematische Darstellung der TDE-Konstrukte.** Die einzelnen Abschnitte sind nicht in ihren tatsächlichen Größenverhältnissen abgebildet. Nur die zur Herstellung dieser Konstrukte benutzten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt. Durchgestrichene Schnittstellen wurden durch die Klonierung zerstört und sind im dargestellten Konstrukt nicht mehr funktionell.

### 3.2.2.2 Untersuchung der Promotoraktivität der TDE-Konstrukte

Zur Ermittlung des Einflusses der TDE-Enhancer auf die Aktivität des MIA/HSVtk-Promotors wurden die TDE-Konstrukte im Vergleich zu den entsprechenden Konstrukten ohne TDE (pCAT-MIA-1386 und pMIA IV) im transienten Transfektionsexperiment getestet. Als Positivkontrolle wurde hier der SV40 (Simian Virus 40)-Promotor im Plasmid pCAT3control verwendet, der verglichen mit dem CMV-Promotor deutlich schwächere Aktivität zeigt. Die CAT-Proteinmenge wurde über einen CAT-ELISA als Maß für die Promotoraktivität ermittelt. In Abb. 3.8 ist das Ergebnis exemplarisch anhand der Melanomzelllinie SK-Mel-23 dargestellt. Ähnliche Experimente wurden auch mit den Melanomzelllinien B16, UKRV-Mel-6a und MeWo sowie in der Kontrollzelllinie HeLa durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Drei TDE-Enhancer haben kaum einen Einfluß auf die Aktivität der Konstrukte aus MIA/HSVtk-Promotor mit oder ohne murine Tyrosinase-Enhancer und neun Kopien bewirken sogar einen deutlichen Abfall der Promotoraktivität. Es zeigte sich in allen getesteten Melanomzelllinien, daß die drei bzw. neun Kopien des TDE-Enhancers keine zusätzliche Steigerung der Promotoraktivität, verglichen mit dem pMIA IV-Plasmid, bewirken. In HeLa-Zellen zeigten die TDE-Elemente keinen Einfluß auf die Spezifität der Ausgangskonstrukte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.8: Einfluß der TDE-Elemente auf die Aktivität der MIA/HSVtk-Promotorkonstrukte ohne oder mit vier murinen Tyrosinase-Enhancern in SK-Mel-23-Zellen.** Dargestellt sind die durch  $\beta$ -Galaktosidase-Tests standardisierten Mittelwerte der CAT-ELISA-Auswertungen aus zwei unabhängigen Experimenten (in Dreifachbestimmung durchgeführt) mit Standardabweichung. Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, am folgenden Tag transfiziert und weitere zwei Tage später die Menge exprimierten CAT-Proteins mittels ELISA bestimmt. Die Aktivität des SV40-Promotors wurde auf 100% festgelegt.

### 3.3 Spezifische Abtötung von Melanomzellen durch zelltypspezifische Expression von "Suizidgenen"

Das Ziel der "Suizidgentherapie" ist es, ein zytotoxisch wirkendes Protein in den malignen Zellen zu exprimieren und diese dadurch abzutöten. Als zytotoxisch wirkende Proteine wurden in dieser Arbeit die A-Kette des bakteriellen Diphtherietoxins (DT-A) und die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (TK) eingesetzt. Die für die beiden "Suizidgene" kodierenden Sequenzen wurden unter die Kontrolle des Tyrosinase-, MIA- und HSVtk-Promotors sowie der entsprechenden Enhancerkonstrukte gestellt und ihre Wirkung auf verschiedene Melanomzelllinien und die Kontrollzelllinie HeLa nach Transfektion der Plasmide mittels MTT-Test bestimmt. Die MIA/HSVtk-Promotorkonstrukte wurden für diese Untersuchungen nicht verwendet, da sie im Vergleich zu den HSVtk-Promotorkonstrukten schwächere Aktivität in den Reporter-genuntersuchungen gezeigt hatten.



### 3.3.1 Wirkung der A-Kette des Diphtherietoxins als "Suizidgen"

Die A-Kette des Diphtherietoxins tötet die Zellen durch Inhibition der Protein-Biosynthese. Die zelltypspezifische Expression des Toxins ist von großer Bedeutung, um gesunde Zellen vor der Expression von DT-A und folgender Abtötung zu schützen. Aus diesem Grund wurde die für DT-A kodierende Sequenz unter die Kontrolle der in Abschnitt 3.1 und 3.2.1 untersuchten regulatorischen Sequenzen des Tyrosinase-, MIA- und HSVtk-Gens mit und ohne Tyrosinase-Enhancer gestellt und in *in vitro* Transfektionsexperimenten mit nachfolgender Bestimmung des Anteils lebender Zellen mittels MTT-Test untersucht.

#### 3.3.1.1 Herstellung der DT-A-Expressionsplasmide

##### DT-A-Expressionsplasmide mit dem Tyrosinasepromotor:

Die für DT-A kodierende DNA-Sequenz wurde mit dem Primerpaar DiphXho5` und DiphSac3` aus dem Plasmid pBI30 DT-A (Maxwell et al., 1986) amplifiziert und somit am 5`-Ende eine *Xho*I- und am 3`-Ende eine *Sac*I-Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde *Xho*I / *Sac*I geschnitten und in pTyr<sub>1</sub>CAT und pTyr IV, aus denen die CAT-Sequenz *Xho*I / *Sac*I entfernt worden war, stromabwärts des Tyrosinasepromotors eingefügt. Aus dem resultierenden Tyrosinasepromotorkonstrukt wurde DT-A *Xho*I / *Sac*I ausgeschnitten und *Xho*I / *Sac*I in pTyr III (ohne CAT) eingefügt. Zusätzlich wurde in alle drei resultierende Plasmide eine Polyadenylierungssequenz (polyA) stromabwärts der DT-A-Sequenz eingefügt. Diese wurde aus dem Plasmid pCR3.1 (Invitrogen) mit den Primern BGH Sac5` und BGHpolyA3` amplifiziert und nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Eco*RI in die Plasmide eingesetzt. Die entstandenen Plasmide wurden pTyr/DT-A, pTyr III/DT-A und pTyr IV/DT-A genannt und zur Überprüfung sequenziert. Die Konstrukte sind in Abb. 3.9 schematisch dargestellt.

##### DT-A-Expressionsplasmide mit dem MIA-Promotor:

Zur Herstellung der MIA-Promotorkonstrukte wurde die DT-A-Sequenz zunächst aus pBI30 DT-A *Pst*I / *Xba*I herausgeschnitten und in die gleichen Schnittstellen des pUC18-Plasmids (Amersham Pharmacia) eingesetzt. DT-A

wurde anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Pst*I und *Sac*I aus dem entstandenen Plasmid herausgeschnitten und das überhängende Ende der *Pst*I-Schnittstelle aufgefüllt. Danach wurde das DT-A-Fragment zwischen die aufgefüllte *Bam*HI-Schnittstelle und die *Sac*I-Schnittstelle im Austausch gegen die CAT-Sequenz und den HSVtk-Promotor in pCAT-MIA-1386 eingesetzt. Das hieraus entstandene Konstrukt diente zur Herstellung der beiden MIA-Promotorkonstrukte mit drei und vier Enhancern, indem die DT-A-Sequenz (und ein Teil des MIA-Promotors) mit *Pst*I / *Sac*I entnommen und in pMIA III und pMIA IV im Austausch gegen CAT und HSVtk-Promotor eingefügt wurde. In die drei resultierenden MIA-Promotorkonstrukte wurde auf die gleiche Weise wie in die Tyrosinasekonstrukten eine Polyadenylierungssequenz 3' der DT-A-Sequenz eingefügt. Die resultierenden Konstrukte wurden als pMIA/DT-A, pMIA III/DT-A und pMIA IV/DT-A bezeichnet und sind schematisch in Abb. 3.9 dargestellt.

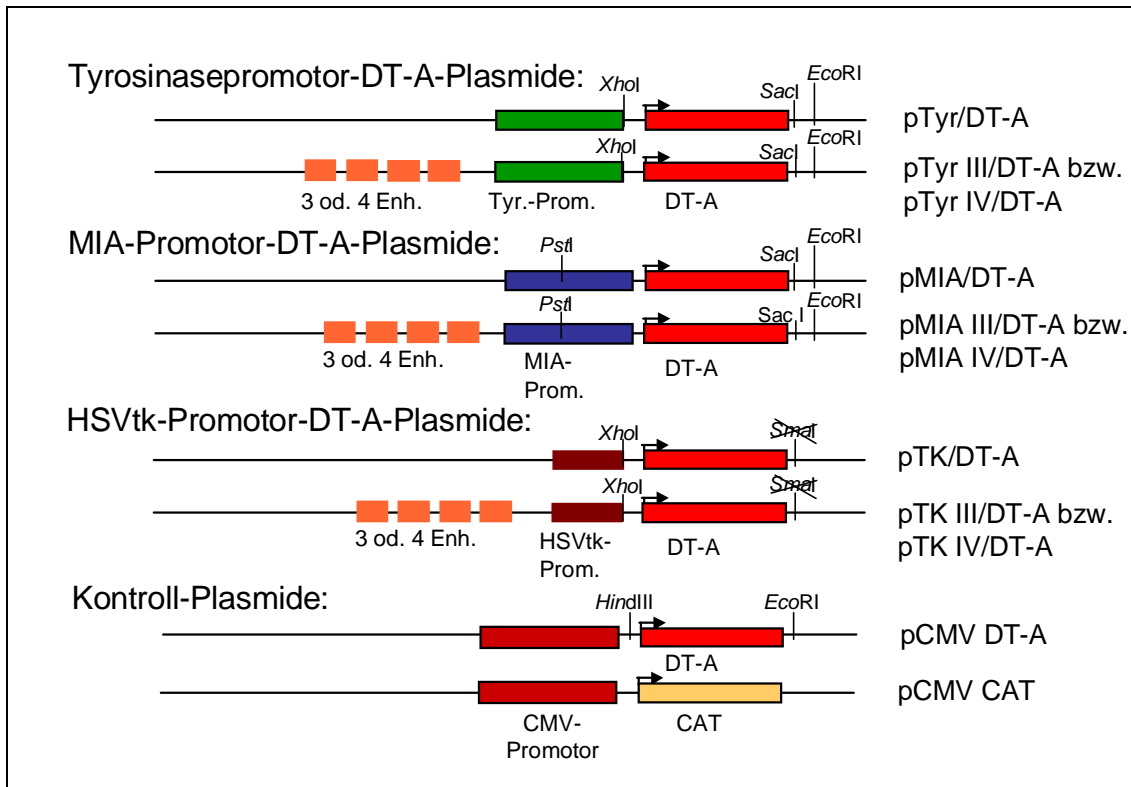
#### DT-A-Expressionsplasmide mit dem HSVtk-Promotor:

Die für DT-A kodierende Sequenz wurde zusammen mit der Polyadenylierungssequenz *Xho*I / *Eco*RI aus pTyr DT-A entnommen, die *Eco*RI-Schnittstelle aufgefüllt und in pTK CAT, pTK III und pTK IV gegen die CAT-Sequenz zwischen den *Xho*I- und *Sma*I-Schnittstellen ausgetauscht. Die entstandenen Konstrukte pTK/DT-A, pTK III/DT-A und pTK IV/DT-A sind in Abb. 3.9 schematisch dargestellt.

#### Kontrollplasmide:

Als Positivkontrolle wurde ein Plasmid hergestellt, welches den unspezifischen, sehr starken CMV-Promotor stromaufwärts der kodierenden Sequenz für DT-A enthält. Dazu wurde DT-A aus pIBI30 DT-A *Xba*I / *Pst*I herausgeschnitten, in pUC18 *Xba*I / *Pst*I eingesetzt und *Hind*III / *Eco*RI wieder herausgeschnitten und in das *Hind*III / *Eco*RI geöffnete pCR3.1-Plasmid stromabwärts des CMV-Promotors kloniert. Das entstandene Plasmid wurde als pCMV/DT-A bezeichnet.

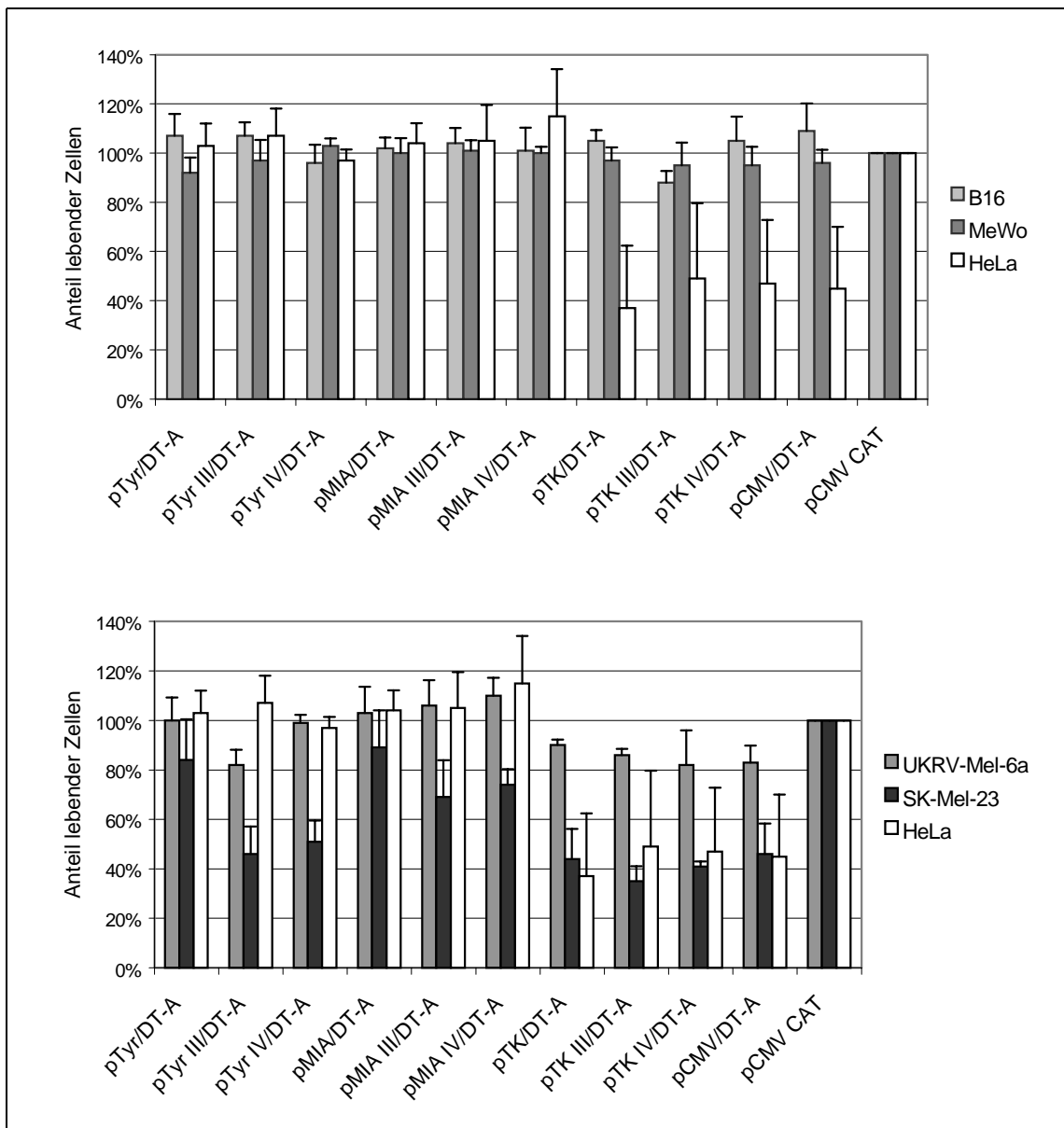
Als Negativkontrolle wurde das schon in 3.1.2 beschriebene pCMV CAT-Plasmid eingesetzt. Beide Kontrollplasmide sind in Abb. 3.9 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.9: Schematische Darstellung der DT-A-Expressionsplasmide.** Die einzelnen Abschnitte sind nicht in ihren tatsächlichen Größenverhältnissen abgebildet. Nur relevanten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt. Durchgestrichene Restriktionsschnittstellen wurden bei der Klonierung zerstört und sind in den dargestellten Konstrukten nicht mehr funktionell. Die eingefügten Polyadenylierungssequenzen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

### 3.3.1.2 Untersuchung der Wirksamkeit der DT-A-Expressionsplasmide

Um die Wirkung der Expression der Diphtherietoxin-A-Kette unter der Kontrolle verschiedener Promotoren und Promomotor/Enhancer-Kombinationen auf das Überleben der Zellen zu untersuchen, wurden die verschiedenen DT-A-Expressionsplasmide in die Melanomzelllinien SK-Mel-23, UKRV-Mel-6a, MeWo und B16 sowie die Kontrollzelllinie HeLa transfiziert. Nach vier Tagen wurde der Anteil der überlebenden Zellen, bezogen auf die Negativkontrolle (pCMV CAT), in der kein DT-A sondern CAT exprimiert wurde, mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.10 dargestellt.



**Abb. 3.10: Anteil lebender Zellen nach Transfektion der DT-A-Expressionsplasmide.** Dargestellt ist das Ergebnis des MTT-Tests aus drei (UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23, HeLa) bzw. vier (B16, MeWo) unabhängigen Experimenten (jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt). Es wurden  $1 \times 10^4$  (B16, SK-Mel-23, HeLa) bzw.  $2 \times 10^4$  (UKRV-Mel-6a, MeWo) Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, am folgenden Tag transfiziert und weitere vier Tage später die Menge lebender Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Der Wert der Positivkontrolle (pCMV CAT) wurde auf 100% festgelegt. Das Ergebnis der Kontrollzelllinie HeLa ist zum Vergleich mit den Melanomzelllinien in beiden Diagrammen gezeigt.

Die DT-A-Expressionsplasmide zeigen unterschiedlich starke Wirkung in den verschiedenen Zelllinien. B16 und MeWo lassen keine deutliche Wirkung der DT-A-Expressionsplasmide erkennen und in diesen beiden Zelllinien überleben auch alle mit der pCMV/DT-A (Positivkontrolle) transfizierte Zellen. Einen minimalen Einfluß auf das Überleben der B16 Zellen zeigt nur das Plasmid pTK III/DT-A, mit dem aber dennoch etwa 90% der Zellen überleben.

In UKRV-Mel-6a dagegen läßt die DT-A-Expression unter der Kontrolle des Tyrosinasepromotors eine Abtötung der Zellen erkennen: nur 80% der Zellen überlebenden, wenn drei Enhancer mit dem Promotor fusioniert sind (pTyr III/DT-A). Die beiden anderen Tyrosinasepromotorplasmide sowie die MIA-Promotorplasmide zeigen keine Wirkung in UKRV-Mel-6a. Auch die HSVtk-Promotorkonstrukte führen zum Absterben eines Teils der UKRV-Mel-6a-Zellen. Nach Transfektion dieser Konstrukte überleben etwa 80-90% der Zellen, was dem Effekt der Positivkontrolle (pCMV/DT-A) entspricht.

Im Gegensatz zu diesen recht schwachen Effekten zeigen die DT-A-Expressionsplasmide sehr gute Wirkung im Abtöten der SK-Mel-23-Zellen. Hier überleben mit den Tyrosinase- und MIA-Promotorplasmid ohne Enhancer (pTyr/DT-A bzw. pMIA/DT-A) weniger als 90% der Zellen und die Zahl der überlebenden Zellen sinkt mit den Konstrukten mit drei bzw. vier Enhancerelementen vor dem Tyrosinasepromotor auf 46% bzw. 51% (pTyr III/DT-A bzw. pTyr IV/DT-A) und mit drei bzw. vier Enhancerelementen vor dem MIA-Promotor auf 69% bzw. 74% (pMIA III/DT-A bzw. pMIA IV/DT-A). Nur um 40% SK-Mel-23-Zellen überleben, wenn sie mit den HSVtk-Promotorplasmiden oder der Positivkontrolle (pCMV/DT-A) transfiziert wurden. Dabei sinkt der Anteil überlebender Zellen auf bis zu 35% mit dem pTK III/DT-A-Konstrukt. Entgegen der Ergebnisse der Reporter-Expressionsanalyse (Abschnitt 3.2.1.2) zeigt sich deutlich, daß der HSVtk-Promotor auch in Verbindung mit den Tyrosinaseenhancern keine selektive Aktivität bei der Abtötung der Zellen durch DT-A in Melanomzellen vermittelt.

Die HSVtk-Promotorplasmide führen nach Transfektion in HeLa-Zellen zum Absterben eines Großteils der Zellen, nur 37% überleben mit dem pTK/DT-A-Plasmid. Dies entspricht etwa der Wirkung des unspezifischen CMV-Promotors in diesen Untersuchungen. Die Tyrosinase- und MIA-Promotorkonstrukte zeigen jedoch hohe Spezifität, um 100% der HeLa-Zellen überleben nach Transfektion dieser DT-A-Expressionsplasmide.

Tendenziell zeigt sich, daß die Tyrosinasepromotorkonstrukte eine etwas höhere spezifische Potenz zum Abtöten der Melanomzellen zeigen als die MIA-Promotorkonstrukte, wobei die Plasmide mit Enhancern die besten Effekte zeigen. Die HSVtk-Promotorkonstrukte töten die Zellen noch effektiver, aber

auch deutlich unspezifischer als die Tyrosinase- und MIA-Promotorkonstrukte.

### 3.3.2 Wirkung der Herpes-Simply-Virus-Thymidinkinase als "Suizidgen"

Im Gegensatz zu DT-A tötet die Herpes-Simply-Virus-Thymidinkinase nur sich teilende Zellen nach Gabe des Medikaments Ganciclovir (GCV). Sie phosphoryliert das als "Prodrug" bezeichnete Medikament GCV, ein Basenanalogen, zu GCV-Phosphat, welches dann in weiteren Schritten zu GCV-Triphosphat umgewandelt wird und bei der Duplikation der DNA zum Abbruch der DNA-Synthese und schließlich zum Tod der Zelle führt. Desweiteren kann das phosphorylierte GCV in nicht transfizierte Nachbarzellen weitergegeben werden und diese ebenfalls abtöten ("Bystander-Effekt"), was den zytotoxischen Effekt dieses Systems erhöht.

In Verbindung mit der kodierenden Sequenz für die Thymidinkinase (TK) wurden Konstrukte mit dem Tyrosinase-, dem MIA- und dem HSVtk-Promotor sowie mit diesen Promotoren in Kombination mit drei und vier Tyrosinase-Enhancerelementen hergestellt und nachfolgend in *in vitro* Transfektionsexperimenten der Anteil überlebender Zellen mittels MTT-Test bestimmt.

#### 3.3.2.1 Herstellung der TK-Expressionsplasmide

##### TK-Expressionsplasmide mit dem Tyrosinasepromotor:

Zur Herstellung der TK-Konstrukte mit dem Tyrosinasepromotor wurde die kodierende Sequenz für TK aus dem Plasmid pSK HSVtk (neu) mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *EcoRI* herausgeschnitten und in die mit den gleichen Enzymen geöffneten Plasmide pTyr<sub>1</sub>CAT, pTyr III und pTyr IV anstelle der CAT-Sequenz hinter den Tyrosinasepromotor gesetzt. Anschließend wurde noch eine Polyadenylierungssequenz hinter die TK-Sequenz gesetzt, die mit den Primern BGH Eco5' und BGHpolyA3' aus pCR3.1 (Invitrogen) amplifiziert worden war und *EcoRI* geschnitten in die *EcoRI*-Schnittstelle dieser Plasmide eingefügt wurde. Die Orientierung der Polyadenylierungssequenz wurde mittels Restriktionsanalyse und die Sequenz durch Sequenzierung überprüft. Die so entstandenen Konstrukte pTyr/TK, pTyr III/TK und pTyr IV/TK sind in Abb. 3.11

schematisch dargestellt.

#### TK-Expressionsplasmide mit dem MIA-Promotor:

Zur Herstellung der Plasmide mit dem MIA-Promotor mußte die TK-Sequenz aus pSK HSVtk (neu) zunächst *XhoI* / *EcoRI* ausgeschnitten und nach Auffüllen der *XhoI*-Schnittstelle in das *SmaI* / *EcoRI* geöffnete pUC18-Plasmid (Amersham Pharmacia) eingesetzt werden. TK wurde dann *BamHI* / *EcoRI* aus pUC18 ausgeschnitten und in pCAT-MIA-1386, pMIA III und pMIA IV (aus denen die CAT-Sequenz und der HSVtk-Promotor dadurch entfernt worden war) subkloniert. Anschließend wurde auch in diese Plasmide wie in die Tyrosinasepromotorplasmide eine Polyadenylierungssequenz stromabwärts der TK-DNA eingesetzt und die Orientierung mittels Restriktionsanalyse und die Sequenz durch Sequenzierung überprüft. Die entstandenen Plasmide wurden pMIA/TK, pMIA III/TK und pMIA IV/TK genannt und sind schematisch in Abb. 11 dargestellt.

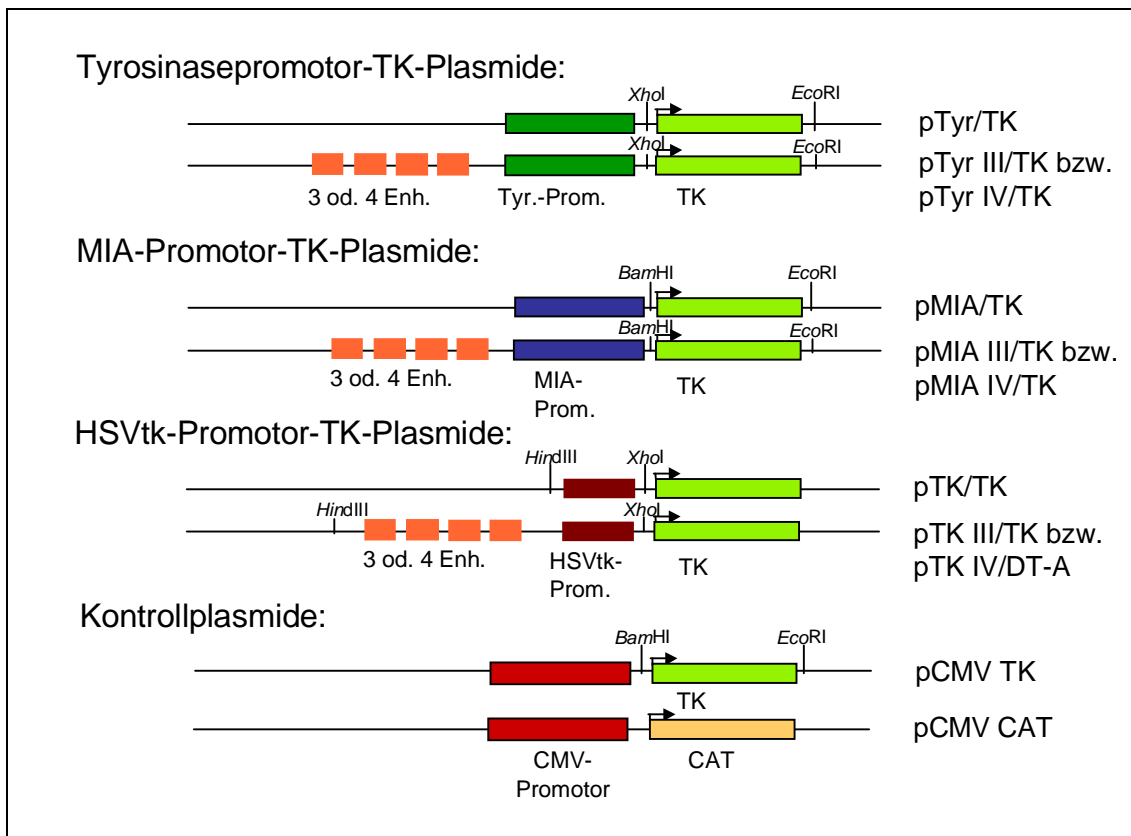
#### TK-Expressionsplasmide mit dem HSVtk-Promotor:

Diese Plasmide wurden hergestellt, indem der HSVtk-Promotor bzw. der HSVtk-Promotor mit den Tyrosinase-Enhancern aus den Plasmiden pTK CAT, pTK III und pTK IV *HindIII* / *XhoI* herausgenommen und in pTyr/TK anstelle des Tyrosinasepromotors *HindIII* / *XhoI* eingefügt wurde. Die resultierenden Plasmide pTK/TK, pTK III/TK und pTK IV/TK sind in Abb. 3.11 dargestellt.

#### Kontrollplasmide:

Als Positivkontrolle wurde wiederum ein Plasmid verwendet, welches den unspezifischen CMV-Promotor stromaufwärts der für TK kodierenden Sequenz enthält. Es wurde hergestellt, indem die TK-DNA *BamHI* / *EcoRI* aus pMIA/TK herausgeschnitten und in pCR3.1 hinter den CMV-Promotor gesetzt wurde.

Als Negativkontrolle wurde das in 3.1.2 beschriebene pCMV CAT-Plasmid eingesetzt. Beide Kontrollplasmide sind in Abb. 3.11 schematisch dargestellt.

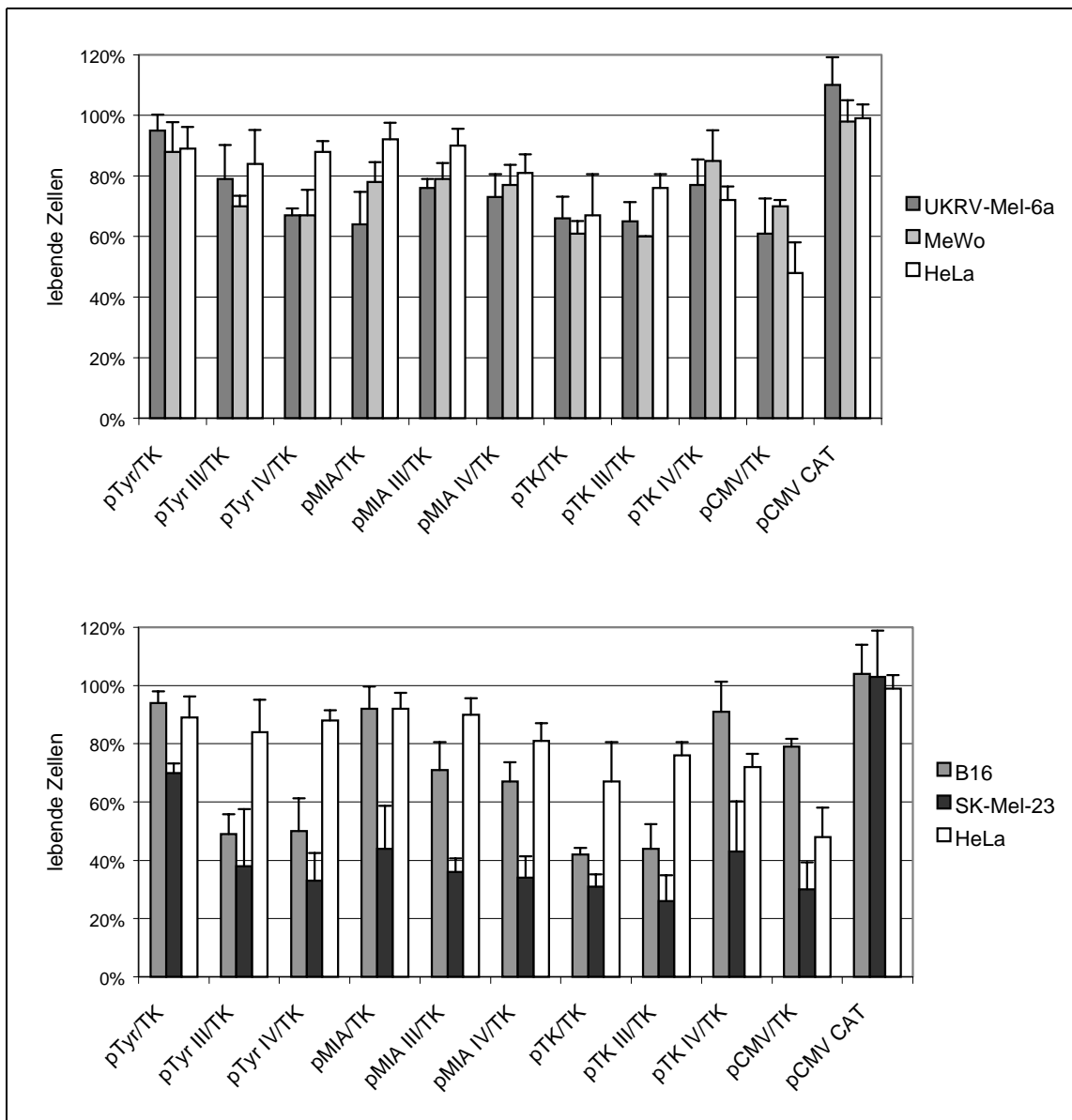


**Abb. 3.11: Schematische Darstellung der TK-Expressionsplasmide.** Die einzelnen Abschnitte sind nicht in ihren tatsächlichen Größenverhältnissen abgebildet. Nur die relevanten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt. Die eingefügten Polyadenylierungssequenzen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

### 3.3.2.2 Untersuchung der Wirksamkeit der TK-Expressionsplasmide

Um zu untersuchen, wie effizient und zelltypspezifisch die TK-Expressionsplasmide Melanomzellen abtöten können, wurden sie in die Melanomzelllinien SK-Mel-23, UKRV-Mel-6a, MeWo und B16 sowie die Kontrollzelllinie HeLa transfiziert. Nach zwei Tagen wurde zu einem Teil der transfizierten Zellen frisches Medium mit 12,5µM GCV gegeben, die andere Hälfte der Zellen erhielt frisches Medium ohne GCV. Nach weiteren drei Tagen wurde ein MTT-Test durchgeführt und der Anteil der lebenden, mit GCV behandelten Zellen, bezogen auf die ebenfalls transfizierten, aber unbehandelten Zellen, bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.12 dargestellt.





**Abb. 3.12: Anteil lebender Zellen nach Transfektion der TK-Expressionsplasmide und Behandlung mit 12,5µM GCV.** Dargestellt ist das Ergebnis des MTT-Tests aus drei (UKRV-Mel-6a, B16, HeLa, MeWo) bzw. vier (SK-Mel-23) unabhängigen Experimenten (jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt). Es wurden  $1 \times 10^4$  (B16, SK-Mel-23, HeLa) bzw.  $2 \times 10^4$  (UKRV-Mel-6a, MeWo) Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, am folgenden Tag transfiziert, zwei Tage später frisches Medium mit oder ohne 12,5µM GCV zugegeben und weitere drei Tage später die Menge lebender Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Der Wert der transfizierten, aber nicht mit GCV behandelten Zellen wurde jeweils auf 100% festgelegt und ist hier nicht dargestellt. Das Ergebnis der Kontrollzelllinie HeLa ist zum Vergleich mit den Melanomzelllinien in beiden Diagrammen gezeigt.

Im Gegensatz zu den DT-A-Expressionsplasmiden zeigen die TK-Expressionsplasmide nach GCV-Behandlung bei allen getesteten Melanomzelllinien deutlichen Einfluß auf den Anteil überlebender Zellen, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung bei den einzelnen Zelllinien. Es kann kein negativer Effekt der GCV-Behandlung auf das Überleben der Zellen

festgestellt werden, wenn keine TK-Enzym exprimiert wird (mit pCMV CAT transfizierte Zellen).

UKRV-Mel-6a- und MeWo-Zellen zeigen nur geringes Ansprechen auf die GCV-Behandlung nach Transfektion mit den TK-Expressionsplasmiden verglichen mit B16- und SK-Mel-23-Zellen, dennoch überleben nach dreitägiger Inkubation mit GCV nur etwa 65% der UKRV-Mel-6a-Zellen, wenn sie mit pTyr IV/TK, pMIA/TK, pTK/TK oder pTK III/TK transfiziert wurden. Die Positivkontrolle pCMV/TK tötet die Zellen nur geringfügig effektiver (61% überlebende Zellen). Bei MeWo zeigen die Tyrosinasepromotorkonstrukte mit drei oder vier Enhancern (70% bzw. 67% überlebende Zellen) sowie die HSVtk-Promotorkonstrukte ohne und mit drei Enhancern (etwa 60% überlebende Zellen) höchste Effektivität. Sie töten die Zellen sogar besser ab als die Positivkontrolle pCMV/TK (70% überlebende Zellen). Die MIA-Promotorkonstrukte sind hier weniger effektiv, fast 80% der Zellen überleben die GCV-Behandlung.

Höhere Wirksamkeit der TK-Expressionsplasmide ist in den Zelllinien B16 und SK-Mel-23 zu erkennen. Die mit den Tyrosinasepromotorplasmiden mit Enhancern transfizierten B16-Zellen werden durch GCV so effektiv getötet, daß nach drei Tagen weniger als 50% der Zellen überleben. Die MIA-Promotorkonstrukte zeigen geringere Effekte (mit Enhancern überleben noch etwa 70% der Zellen) während das HSVtk-Promotorplasmid ohne Enhancer (pTK/TK) zur Abtötung der meisten Zellen führt und nur etwa 40% überleben. Dies liegt weit unter dem Anteil überlebender Zellen mit der Positivkontrolle (pCMV/TK) von etwa 80%. Fast keinen Effekt zeigen die Konstrukte pTyr/TK, pMIA/TK und auch pTK III/TK in B16-Zellen.

Die größte Effektivität zeigen die TK-Expressionsplasmide in der Zelllinie SK-Mel-23. Hier überleben sowohl mit den Tyrosinase- als auch mit den MIA-Promotorplasmiden, die drei oder vier Enhancerelemente enthalten, nur 30-40% der Zellen die dreitägige GCV-Behandlung, mit dem pTK III/TK-Plasmid sogar nur 26%. Dies liegt im Bereich der Effektivität des CMV-Promotorplasmids (30% überlebende Zellen).

Die TK-Expressionsplasmide mit dem Tyrosinase- und MIA-Promotor zeigen hohe Zelltypspezifität, allerdings nicht in dem Maße, wie es die

Reportergenexpression in Abschnitt 3.2.1.2 erwarten ließ, denn nicht alle HeLa-Zellen, sondern nur etwa 80-90%, überleben die GCV-Behandlung nach Transfektion dieser Plasmide. Auch die TK-Expressionsplasmide mit dem HSVtk-Promotor zeigen wie schon bei den DT-A-Expressionsplasmiden unspezifische Aktivität in HeLa-Zellen, wenn auch nicht in so hohem Maße. Es überleben aber weniger als 70% der HeLa-Zellen die GCV-Behandlung, wenn sie mit dem HSVtk-Promotorplasmid pTK/TK transfiziert wurden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit der Expressionskontrolle durch den Tyrosinase- und den MIA-Promotor deutliche zytotoxische Effekte selektiv in Melanomzellen erzielt werden können, die im besten Fall zum Überleben von nur etwa 30% der Melanomzellen unter den vorliegenden Testbedingungen führen. Allerdings zeigt sich auch hier wie bei den DT-A-Expressionsplasmiden, daß die Wirkung der Konstrukte deutliche Unterschiede in den einzelnen Zelllinien zeigt. Auch hier zeigen die Plasmide mit Enhancern tendenziell größere Effekte als die Plasmide ohne Enhancer und die Tyrosinasepromotorplasmide zeigen meist bessere Wirksamkeit als die MIA-Promotorplasmide. Die HSVtk-Promotorplasmide zeigen eine recht hohe unspezifische Wirkung in HeLa-Zellen und scheinen daher für die spezifische Melanomzelltherapie weniger gut geeignet.

### **3.3.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Eine Ursache für die zu beobachtenden Unterschiede in der Wirksamkeit der "Suizidgen"-Expressionsplasmide in den einzelnen Zelllinien könnte die unterschiedliche Transfektionseffizienz sein. Um die Unterschiede in der Wirkung der "Suizidgen"-Plasmide in den einzelnen Zelllinien besser bewerten zu können, wurde die Transfektionseffizienz der Zelllinien mit Hilfe eines GFP (Green Fluorescent Protein)-Expressionsplasmids bestimmt. Dazu wurden die Zelllinien SK-Mel-23, UKRV-Mel-6a, MeWo, B16 und HeLa unter den gleichen Bedingungen, die bei der Transfektion der "Suizidgen"-Expressionsplasmide angewendet wurden, mit einem GFP-Expressionsplasmid (pEGFP-IRES-hyg, Clontech) unter Verwendung des Fugene6-Transfektionsreagenz der Firma Roche transfiziert und der Anteil der GFP-positiven Zellen zwei Tage später mittels FACScan bestimmt. Die Transfektionseffizienz der einzelnen Zelllinien ist

in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

| Zelllinie   | Transfektionseffizienz<br>(Anteil GFP-positiver Zellen) |
|-------------|---|
| HeLa        | 49% $\pm$ 10%   |
| SK-Mel-23   | 31% $\pm$ 8%  |
| UKRV-Mel-6a | 20% $\pm$ 6%  |
| B16         | 17% $\pm$ 5%  |
| MeWo        | 3% $\pm$ 1%   |

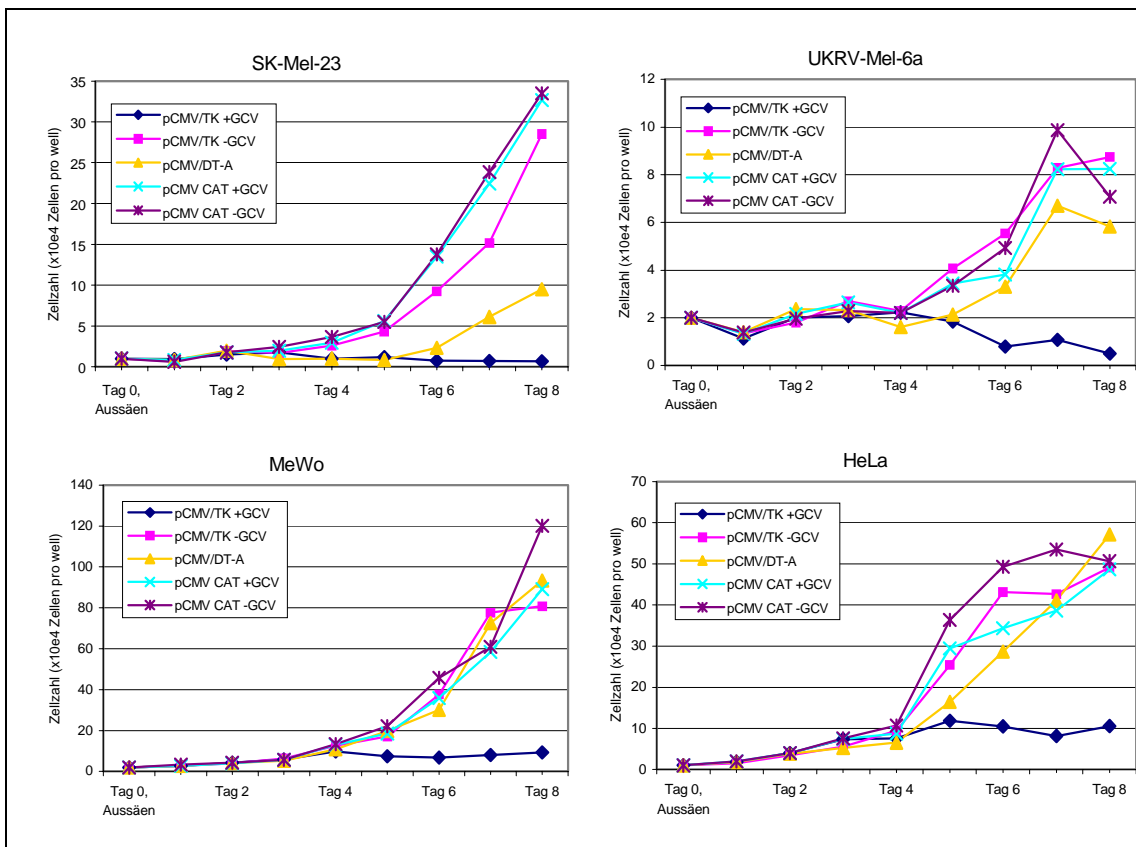
**Tab. 3.1: Transfektionseffizienz.** Gezeigt ist der mittlere Anteil GFP-positiver Zellen zwei Tage nach Transfektion eines GFP-Expressionsplasmids (pEGFP-IRES-hyg) aus drei unabhängigen Experimenten unter Angabe der Standardabweichung. Die Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie mit den DT-A- und TK-Expressionsplasmiden (siehe 3.3.1.2 und 3.3.2.2) transfiziert und der Anteil positiver Zellen zwei Tage später mittels FACscan bestimmt.

Es sind deutliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz der untersuchten Zelllinien nach transienter Transfektion des GFP-Expressionsplasmids erkennbar. Am schlechtesten transfizierbar zeigt sich die Zelllinie MeWo mit 3% GFP-positiven Zellen und am besten transfizierbar mit 49% positiven Zellen sind HeLa-Zellen. Dazwischen liegen SK-Mel-23 mit 31%, UKRV-Mel-6a mit 20% und B16 mit 17%. Das Ergebnis zeigt also mit Ausnahme von MeWo insgesamt eine recht gute Transfizierbarkeit der untersuchten Zelllinien, deren Unterschiede aber durchaus Einfluß auf den Anteil überlebender Zellen nach Transfektion der "Suizidgen"-Expressionsplasmide haben könnten.

### 3.3.4 Vergleich der Wirksamkeit von DT-A und TK als "Suizidgen" im zeitlichen Verlauf

In Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 wurde die Wirksamkeit von DT-A bzw. TK zu einem bestimmten Zeitpunkt, nämlich vier Tage nach Transfektion bzw. drei Tage nach GCV-Zugabe, bestimmt. Nun sollten die Plasmide mit den unterschiedlichen Promotoren im Hinblick auf Spezifität und Effizienz verglichen werden. Der Zeitpunkt der Messung in diesen Untersuchungen ergab sich unter anderem aus versuchstechnischen Gründen und stellt nicht unbedingt den Zeitpunkt dar, zu dem der maximale Effekt der Konstrukte, also der niedrigste Anteil überlebender Zellen, meßbar ist. Aus diesem Grund sollte im folgenden untersucht werden, wie sich die Expression von DT-A und TK unabhängig vom Promotor sowie die GCV-Behandlung auf die Zahl der überlebenden Zellen über einen längeren Zeitraum auswirkt.

Dazu wurden die Zelllinien UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23, B16, MeWo und HeLa unter den gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 mit den Plasmiden pCMV/TK, pCMV/DT-A und als Kontrolle mit pCMV CAT transfiziert und über einen Zeitraum von acht Tagen täglich die Zahl der lebenden Zellen nach Färbung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Ergebnisse für die Zelllinien UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23, MeWo und HeLa sind in Abb. 3.13 dargestellt.



**Abb. 3.13: Vergleich der Auswirkung der DT-A- und TK-Expression auf das Überleben der Zellen im zeitlichen Verlauf.** Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis für die Zelllinien SK-Mel-23, UKRV-Mel-6a, MeWo und HeLa. An Tag 0 wurden  $1 \times 10^4$  (SK-Mel-23, HeLa) bzw.  $2 \times 10^4$  (UKRV-Mel-6a, MeWo) Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, an Tag 1 transfiziert und an Tag 3 frisches Medium mit oder ohne  $12,5 \mu\text{M}$  GCV zugegeben. Die Zahl der lebenden Zellen (Mittelwert aus drei Wells) wurde jeden Tag nach Färbung der Zellen mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Standardabweichung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

In den Zelllinien B16 (hier nicht gezeigt) und MeWo bestätigt sich die Beobachtung aus Abschnitt 3.3.1.2, daß Transfektion eines DT-A-Expressionsplasmids, selbst wenn es sich wie hier um das CMV-Promotorkonstrukt (pCMV/DT-A) handelt, keinen Einfluß auf das Wachstum der

Zellen zeigt, während TK mit GCV-Behandlung gute Wirksamkeit im Abtöten der Zellen erkennen läßt. Im Vergleich der beiden "Suizidgene" DT-A und TK zeigt sich bei allen getesteten Zelllinien deutlich die Überlegenheit von TK in der Abtötung der Zellen nach GCV-Zugabe. Dieser Effekt ist eindeutig auf die Kombination von TK und GCV zurückzuführen, da weder die Expression von TK alleine (pCMV/TK -GCV) noch die Gabe von GCV in CAT-exprimierenden Zellen (pCMV CAT +GCV) einen signifikanten Einfluß auf das Wachstum der Zellen verglichen mit der pCMV CAT-transfizierten Kontrolle (pCMV CAT -GCV) hat. Während die Zellzahl in allen untersuchten Zelllinien nach GCV-Gabe konstant bleibt oder abfällt, steigt die Zellzahl nach Transfektion des DT-A-Expressionsplasmids weiter an, wenn auch verzögert verglichen mit der CAT-Kontrolle.

Dieser Unterschied in der Wirksamkeit der beiden "Suizidgene" könnte ein Hinweis dafür sein, daß mit DT-A nur die transfizierten Zellen absterben, während der größere, nicht transfizierte Teil der Zellen weiter wächst. Die stärkere Wirksamkeit von HSVtk hingegen könnte auf den "Bystander-Effekt" zurückzuführen sein, wobei nicht nur die transfizierten, sondern auch die nicht transfizierten Nachbarzellen sterben.

## 4 DISKUSSION

Patienten mit metastasiertem Melanom haben wenig Hoffnung auf Heilung. Die therapeutische Effizienz der klassischen Behandlungsmöglichkeiten (Bestrahlung, Chemotherapie) erweist sich im metastasierten Stadium der Erkrankung als äußerst gering (zur Übersicht: Bergmann, 1989; Johnson et al., 1995). Deshalb besteht ein enormer Bedarf an neuen, effektiveren Therapieansätzen für eine gezielte Behandlung dieses extrem aggressiven Tumors der Haut. Ein vielversprechender Ansatz für eine solche Tumorthherapie ist die Gentherapie (zur Übersicht: Rochlitz, 2001). Bei einer Form der Gentherapie, der Immun-Gentherapie, werden Gene mit immunmodulatorischer Funktion in die Tumorzellen, Fibroblasten oder Immunzellen eingebracht, die entweder die Immunogenität des Tumors erhöhen (z.B. Zytokingene) oder die Effektivität von Immunzellen erhöhen, die Tumorzellen abzutöten (z.B. durch Gene kodierend für Zytokine, Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle oder chimäre Antikörper-T-Zell-Rezeptormoleküle). Eine weitere Möglichkeit der Gentherapie ist die Reparatur der gestörten Zellteilung der Tumorzelle. Dies kann durch Inaktivierung von Onkogenen (z.B. durch Antisense-Oligonukleotide) oder durch Reaktivierung von ausgefallenen Tumor-Suppressor-Genen nach Einbringen des Wildtyp-Gens geschehen. Der direkteste Weg, Tumorzellen mit Hilfe der Gentherapie auszuschalten, ist die "Suizidgentherapie". Diese hat zum Ziel, Tumorzellen durch gezielte Expression direkt oder indirekt toxisch wirkender Proteine abzutöten, wobei jedoch mit den heutigen Methoden noch ein Problem darin besteht, alle Tumorzellen mit dieser Art der Therapie zu erreichen. Allerdings ermöglicht die selektive Expression der "Suizidgene" eine gezieltere Abtötung der Tumorzellen, als sie z.B. durch die relativ unspezifisch auf viele Zellarten wirkende Chemotherapie erreicht werden kann.

Um die toxische Wirkung der durch die "Suizidgene" kodierten Proteine auf die Tumorzellen zu beschränken, muß deren Expression in gesunden Zellen vermieden werden. Dies kann durch selektive Expression der therapeutischen Gene und durch selektive Aufnahme der therapeutischen Konstrukte in die maligne Zelle ("Targeting") erreicht werden. Die selektive Expression wird durch

gewebespezifische genregulatorische Elemente (Promotoren, Enhancer) gewährleistet. So ermöglicht z.B. der "Carcinoembryonic Antigen" (CEA)-Promotor spezifische Expression von "Suizidgenen" in CEA-positiven Adenokarzinomzellen der Lunge und des Kolons (Osaki et al., 1994; Richards et al., 1993) und der "Prostate-Specific Antigen" (PSA)-Promotor spezifische Expression in Prostata-Karzinomzellen (Pang, 2000).

Zur selektiven Genexpression in melanozytären Zellen eignet sich beispielsweise der Tyrosinasepromotor, was schon in verschiedenen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte (Siders et al., 1998; Vile & Hart, 1993). Aber auch der MIA-Promotor steht für die Genexpression in Melanomzellen zur Verfügung. MIA wird nur in Melanomzellen und Chondrozyten (Blesch et al., 1994; Bosserhoff et al., 1997b) sowie einigen anderen malignen Zellen (Bosserhoff et al., 1999; Perez et al., 2000) exprimiert, die Aktivität des MIA-Promotors wurde jedoch im Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit sollten nun "Suizidgen"-Plasmide für die Gentherapie des malignen Melanoms entwickelt werden, die Melanomzellen selektiv und effizient abtöten.

Im Gegensatz zum universell in eukaryontischen Zellen stark aktiven CMV (Cytomegalo-Virus)-Promotor entwickelt der zelltypspezifische Tyrosinase- und MIA-Promotor, aber auch der virale Thymidinkinasepromotor (HSVtk-Promotor) nur schwache, basale Aktivität in Melanomzellen. Da diese schwache Aktivität möglicherweise für eine effektive Expression eines "Suizidgens" und damit für eine effektive Abtötung der Melanomzellen nicht ausreicht, sollte sie selektiv in Melanomzellen gesteigert werden. Deshalb wurden der Tyrosinase-, MIA- und HSVtk-Promotor zunächst mit mehreren melanozytenspezifischen Enhancerelementen fusioniert und anschließend diese Promotor/Enhancer-Konstrukte zur Expression von TK und DT-A eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß Tyrosinase- und MIA-Promotorkonstrukte Melanomzellen effizient und selektiv abtöten können.



#### **4.1 Endogene Tyrosinase- und MIA-Expression ist in verschiedenen Melanomzelllinien, nicht aber in HeLa nachweisbar**

Die endogene Tyrosinase- und MIA-Expression wurde mittels Northern Blot Analyse in den humanen Melanomzelllinien UKRV-Mel-6a, SK-Mel-23 und MeWo, in der Maus-Melanomzelllinie B16 sowie der Cervixkarzinomzelllinie HeLa untersucht. In den humanen Melanomzelllinien ist sowohl Tyrosinase- als auch MIA-mRNA nachweisbar, während in den nicht-melanozytären HeLa-Zellen keine der beiden mRNAs detektierbar ist. Dies zeigt, daß in diesen Melanomzelllinien die Voraussetzungen für die Aktivität der Tyrosinase- und MIA-Promotorplasmide (z.B. das Vorhandensein der benötigten Transkriptionsfaktoren) gegeben sind und die beiden mRNAs selektiv in Melanomzellen, nicht jedoch in HeLa-Zellen exprimiert werden. Damit ist Tyrosinase-mRNA auch in den unpigmentierten Melanomzelllinien UKRV-Mel-6a und MeWo nachweisbar. Die Beobachtung, daß der Nachweis von Tyrosinase-mRNA unabhängig vom Pigmentgehalt der Melanomzellen ist, steht im Einklang zur Arbeit von Naeyaert et al. (1991), die dies für verschiedene humane Melanom- und Melanozytenlinien zeigen konnten.

In der murinen Melanomzelllinie B16 kann nur Tyrosinase-, nicht aber MIA-mRNA nachgewiesen werden. Das Fehlen des MIA-Signals kann auf die Verwendung einer möglicherweise nicht optimal hybridisierenden humanen MIA-Sonde zum Nachweis der Maus-mRNA zurückzuführen sein. Dies ist jedoch kaum wahrscheinlich, da die humane MIA-Sonde 84% Identität mit dem hybridisierenden murinen mRNA-Abschnitt aufweist. Den gleichen Anteil identischer Sequenz enthält die humane Tyrosinase-Sonde, die gut mit der murinen mRNA für Tyrosinase in B16 hybridisiert. Eine weitere Ursache für den fehlenden Nachweis von MIA-mRNA in B16-Zellen könnte der Verlust der MIA-Expression im Laufe der Kultivierung durch Veränderungen im Genom der Zellen (z.B. Deletionen im MIA-Gen) sein.

Trotz fehlenden Nachweises endogener MIA-Expression zeigen die MIA-Promotorplasmide in den Reporter-genuntersuchungen gute Aktivität in den B16-Zellen (siehe Abschnitt 3.1.2.2 und 3.2.1.2); die notwendigen

Transkriptionsfaktoren sind also vorhanden. Dies gilt entsprechend auch für die humane Melanomzelllinie UKRV-Mel-6a, bei der Tyrosinase nur sehr schwach nachweisbar ist, der Tyrosinasepromotor jedoch in den Reporter-gen-untersuchungen funktionell ist.

## **4.2 Die melanomzellspezifische Aktivität der untersuchten Promotoren kann durch murine Tyrosinase-Enhancerelemente stark erhöht werden**

### **4.2.1 Die Aktivitätssteigerung des Tyrosinasepromotors durch Enhancer**

Die zelltypspezifische Steigerung der Tyrosinasepromotoraktivität durch Kopien des murinen Enhancerelements (Ganss et al., 1994a) wurde schon in verschiedenen Studien untersucht. So konnten Artuc et al. (1995) die Aktivität des murinen Tyrosinasepromotors durch Fusion mit einem Enhancerelement unter anderem in UKRV-Mel-6- und SK-Mel-23-Zellen steigern. Allerdings variierte die erreichte Aktivitätssteigerung in Abhängigkeit von der untersuchten Melanomzelllinie stark: Die Aktivität des Tyrosinasepromotors ließ sich z.B. in UKRV-Mel-6 überhaupt nicht erhöhen, während sie in der Zelllinie SK-Mel-23 21-fach erhöht wurde. Demgegenüber wurde in der vorliegenden Arbeit bei SK-Mel-23 mit einem Enhancer eine Steigerung der Aktivität um das 3-fache gezeigt, während sich bei UKRV-Mel-6a mit einem Enhancer ebenfalls keine deutliche Aktivitätssteigerung feststellen ließ (Abb. 3.5). Die Differenz bei der Aktivierung in SK-Mel-23-Zellen könnte auf die unterschiedliche experimentelle Durchführung (abweichende Klonierung des Enhancers, andere Transfektionsbedingungen und unterschiedliche Methoden zur Bestimmung und Analyse der CAT-Expression) und/oder Veränderungen in der Zelllinie (Veränderungen der Protein-/Transkriptionsfaktor-Expression z.B.) zurückzuführen sein. Während Artuc et al. ein *Styl/Sspl* Enhancerfragment verwendeten, wurde der Enhancer in dieser Arbeit durch PCR amplifiziert und ist bedingt durch die Auswahl der Primer an beiden Enden wenige Nukleotide kürzer. Dadurch enthält das Enhancerfragment andere flankierende Sequenzen als in der Arbeit von Artuc et al. (1995), was sich möglicherweise auf die Aktivität auswirken könnte.

Siders et al. (1996) und Park et al. (1999) konnten mit bis zu zwei Kopien des murinen Enhancerelements ebenfalls eine deutliche Steigerung der zelltypspezifischen Aktivität des schwachen murinen bzw. humanen Tyrosinasepromotors erreichen. Auch hier unterscheiden sich die Ergebnisse der Aktivitätssteigerung je nach experimentellem System (z.B. unterschiedliche Reportergene und Zelllinien, humanes und murines System). Siders et al. erreichen eine Steigerung um das nahezu 7-fache mit einem und um das 43-fache mit zwei Enhancern, während Park et al. von einer bis zu 5-fachen Aktivitätssteigerung mit einem und einer bis zu 500-fachen Steigerung mit zwei Enhancern berichten (was etwa 65 bzw. 28% der CMV-Promotoraktivität in den dort verwendeten Melanomzelllinien entspricht). Diese drastischen Unterschiede zeigen deutlich, daß verschiedene experimentelle Systeme bei der Untersuchung der Enhancerelemente nur schwer zu vergleichen sind. In der vorliegenden Arbeit konnte mit zwei Enhancern in den Zelllinien SK-Mel-23 und UKRV-Mel-6a nur eine etwa 6-fache Steigerung der Tyrosinasepromotoraktivität erreicht werden, was weniger als 1% der CMV-Promotoraktivität darstellt. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, daß drei oder sogar vier murine Enhancerelemente die Aktivität des murinen Tyrosinasepromotors in den humanen Melanomzelllinien SK-Mel-23 und UKRV-Mel-6a im Vergleich zu ein und zwei Enhancerelementen noch weiter zelltypspezifisch erhöhen (Abb. 3.5). In der Zelllinie SK-Mel-23 führen vier Enhancerelemente zur maximalen Aktivitätssteigerung um das 14-fache des Tyrosinasepromotors ohne Enhancer, bei UKRV-Mel-6a liegt die maximale Aktivität in Verbindung mit drei Tyrosinase-Enhancern und entspricht hier einer 9-fachen Erhöhung.

Obwohl die Aktivität der Tyrosinasepromotorplasmide in der vorliegenden Arbeit trotz Fusion mit drei oder vier Kopien des Enhancerelements weniger als 2% der CMV-Promotoraktivität beträgt und sich verglichen mit den Ergebnissen aus der Literatur eher niedrige Steigerungsraten ergeben, zeigen sie bei der Expression der "Suizidgene" zytotoxische Wirkungen, die in ihrer Stärke mit den zytotoxischen Effekten der CMV-Promotorkonstrukte vergleichbar sind. Dies deutet darauf hin, daß die Expressionsstärke der "Suizidgene" nicht ausschlaggebend für die zytotoxische Wirksamkeit ist (siehe 4.3.3).

#### **4.2.2 Die murinen Enhancerelemente steigern auch die Aktivität des MIA-Promotors melanomzellspezifisch**

Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich auch die Aktivität des MIA-Promotors durch heterologe, aus dem murinen Tyrosinasegen stammende Enhancerelemente steigern läßt. Durch die Fusion mit vier Enhancerelementen wurde eine Steigerung der Aktivität des MIA-Promotors um das 28-fache in SK-Mel-23 auf fast 3% der CMV-Promotoraktivität erreicht. Der MIA-Promotor ohne Enhancer entwickelt in allen getesteten Melanomzelllinien eine Aktivität unter 0,5% verglichen mit dem CMV-Promotor. Weder die Konstrukte mit dem MIA-Promotor alleine noch die Enhancer-Konstrukte zeigen nachweisbare Aktivität in HeLa-Zellen.

#### **4.2.3 Der unspezifische HSVtk-Promotor wird durch die Enhancer melanomzellspezifisch aktiviert**

Die Fusion des MIA-Promotors mit dem unspezifischen HSVtk-Promotor in dem Plasmid pCAT-MIA-1386 führt zu einer deutlichen Zunahme der Promotoraktivität gegenüber den beiden Einzelpromotoren in den Melanomzelllinien B16, UKRV-Mel-6a und SK-Mel-23, steigert jedoch nicht die schwache Aktivität des HSVtk-Promotors in HeLa (Abb. 3.3). Dies ist möglicherweise auf eine Hochregulation der Promotoraktivität durch zelltypspezifische Faktoren zurückzuführen, die an den MIA-Promotor binden. Ein solcher Faktor könnte der erst kürzlich von Golob et al. (2000) beschriebene melanomzellspezifische Transkriptionsfaktor MATF ("Melanoma-Associated Transcription Factor") sein, der an den MIA-Promotor bindet und dadurch die MIA-Transkription aktiviert.

Die Kombination des MIA/HSVtk-Promotors mit murinen Tyrosinase-Enhancerelementen steigert die Aktivität auf das 8- bzw. 12-fache, wobei die maximale Aktivität mit vier Enhancern erreicht wird. Die Fusion eines fünften Enhancers führt zur deutlichen Abnahme der Aktivität verglichen mit dem Plasmid, das den vierfachen Enhancer enthält. Dies könnte auf eine sterische Hemmung der bindenden Faktoren bei zu großer Anzahl der Bindungsstellen oder zu geringen Abstand zurückzuführen sein.

Obwohl es sich bei dem HSVtk-Promotor um einen unspezifischen Promotor

handelt, führt die Fusion mit dem zelltypspezifischen MIA-Promotor und/oder mit drei oder vier Kopien des melanozytenspezifischen murinen Tyrosinase-Enhancers zu einer Steigerung der Aktivität ausschließlich in Melanomzellen (Abb. 3.6). Diese selektive Aktivitätssteigerung des HSVtk-Promotors durch heterologe Sequenzelemente steht in Einklang zu den Ergebnissen von Manome et al. (1994) und Kumagai et al. (1996), die durch Enhancersequenzen des in den meisten Mammakarzinomen überexprimierten DF3-Gens bzw. Bindungssequenzen für den heterodimeren Myc-Max-Transkriptionsfaktor eine tumorzellspezifische Überexpression des nachgeschalteten Gens zeigen konnten.

#### **4.2.4 Die TDE-Enhancer führen zu keiner zusätzlichen Steigerung der Promotoraktivität**

Das von Yasumoto et al. (1994) identifizierte "Tyrosinase Distal Element" aus dem humanen Tyrosinasepromotor (Nukleotide -1861 bis -1842) enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor MITF ("Microphthalmia-Associated Transcription Factor") und vermittelt die zelltypspezifische Expression von Tyrosinase. Diaz et al. (1998) konnten durch Fusion des SV40-Promotors mit drei Kopien des TDE in einem retroviralen Vektor spezifische Expression in MeWo-Melanomzellen verglichen mit HeLa-Zellen erreichen. Desweiteren zeigten sie eine spezifische Aktivitätssteigerung des Tyrosinasepromotors durch einen TDE-Enhancer in MeWo-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Kopien des TDE in Kombination mit dem MIA/HSVtk-Promotor sowie drei und neun TDE-Enhancer in Kombination mit dem MIA/HSVtk-Promotor zusätzlich zu vier murinen Tyrosinase-Enhancern getestet. Auch hier zeigen die Konstrukte Spezifität für Melanomzellen (Daten nicht gezeigt), drei TDE-Kopien konnten aber weder die Aktivität des MIA/HSVtk-Promotors noch die des MIA/HSVtk-Promotors mit vier murinen Enhancern signifikant erhöhen. Neun TDE-Enhancer führten sogar zu einem deutlichen Rückgang der Aktivität des MIA/HSVtk-Promotors mit vier murinen Enhancern um fast 50%. Die TDE-Enhancer konnten die Aktivität des MIA/HSVtk-Promotors in dieser Arbeit demnach nicht deutlich steigern. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Yasumoto et al. (1994), die mit drei Kopien des TDE eine deutliche (etwa 8-fache) Erhöhung der

Reportergenexpression zeigen konnten. Die fehlende Aktivierung durch die TDE-Enhancer in der vorliegenden Arbeit könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß hier die TDE-Enhancer mit dem MIA/HSVtk-Promotor (etwa 1,6kb) kombiniert wurden, während Yasumoto und Mitarbeiter den Tyrosinasepromotor (0,2kb) verwendeten, und somit ein ganz anderer Sequenzzusammenhang besteht. Eventuell führt auch die Kombination der TDE-Enhancer mit dem relativ langen MIA/HSVtk-Promotor vor allem durch zusätzliche Fusion mit vier murinen Enhancerelementen (insgesamt fast 2,4kb) zur Abnahme der Aktivität durch sterische Hemmung der bindenden Faktoren, wenn weitere neun Kopien des TDE-Enhancers fusioniert werden. Ein weiterer Unterschied zwischen den hier gezeigten Untersuchungen und der Arbeit von Yasumoto und Kollegen besteht in der Untersuchung der TDE-Aktivität in unterschiedlichen Zelllinien (MeWo bzw. SK-Mel-23), was eine weitere Ursache für die abweichenden Ergebnisse darstellen könnte.

### **4.3 Vergleich der Effizienz der DT-A- und TK-Expressionsplasmide**

#### **4.3.1 Die TK-Expressionsplasmide sind effizienter in der Abtötung der Melanomzellen als die DT-A-Expressionsplasmide**

DT-A tötet die Zellen durch Inhibition der Translation. Durch das Fehlen der B-Kette können die DT-A-Moleküle jedoch nicht in andere Zellen eindringen (Übersicht: Falnes & Sandvig, 2000), es werden somit nur Zellen getötet, die DT-A selbst exprimieren, also zuvor mit den Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Im Gegensatz dazu werden im TK/GCV-System auch benachbarte, untransduzierte Tumorzellen abgetötet, was als "Bystander-Effekt" bezeichnet wird (Culver et al., 1992; Freeman et al., 1993). Dieser Effekt stellt bei limitierter Transfektionseffizienz einen bedeutenden positiven Faktor für die Effizienz des Systems dar. Allerdings liegt der Nachteil im TK/GCV-System darin, daß nur sich teilende Zellen abgetötet werden, da die toxische Wirkung durch den Einbau von GCV-Triphosphat und Hemmung der DNA-Polymerase  $\alpha$  bei der Replikation der Zelle vermittelt wird (Reid et al., 1988; St Clair et al., 1987).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun beide Systeme vergleichend untersucht. Im Vergleich der Effizienzen der DT-A- und der TK-Expressionsplasmide in der

Abtötung von Melanomzellen zeigen die TK-Expressionsplasmide in Verbindung mit GCV deutliche Überlegenheit. Nach Transfektion verschiedener selektiv in Melanomzellen exprimierter TK-Plasmide leben nur noch um 30% der SK-Mel-23-Melanomzellen nach dreitägiger Inkubation mit GCV unter den hier getesteten Bedingungen (Abb. 3.12). Dagegen überleben in der am besten ansprechenden Zelllinie SK-Mel-23 immer noch um 50% der Zellen vier Tage nach Transfektion der potentesten, zelltypspezifischen DT-A-Expressionsplasmide (Abb. 3.10). Außerdem sprechen zwei (B16, MeWo) von vier Melanomzelllinien nicht nachweisbar auf die DT-A-Konstrukte an, selbst wenn DT-A unter der Kontrolle des starken, unspezifischen CMV-Promotors exprimiert wird. Nach Transfektion der meisten TK-Expressionsplasmide und nachfolgender Behandlung mit GCV wird dagegen bei allen vier getesteten Melanomzelllinien ein deutlicher Anteil der Zellen abgetötet.

Die Ursache für das nicht nachweisbare Abtöten der B16- und MeWo-Zellen durch DT-A-Expression kann im gewählten Meßsystem (MTT-Test) liegen, denn der MTT-Test läßt nur eine Aussage über die relative Zahl lebender Zellen zum Meßzeitpunkt zu, erfaßt aber nicht die abgetöteten Zellen selbst. Der Verlust weniger Zellen wird jedoch von den überlebenden Zellen schnell durch ihr eigenes Wachstum überdeckt. Für die unterschiedliche Effizienz der "Suizidgene", Melanomzellen abzutöten, ist vermutlich zu einem großen Teil ihr unterschiedlicher Wirkungsmechanismus verantwortlich. Die Rolle der Transfektionseffizienz und des "Bystander-Effekts" für die unterschiedliche Effizienz wird im Zusammenhang mit den Wirkungsmechanismen von DT-A und TK im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### **4.3.1.1 Die Rolle der Transfektionseffizienz und des "Bystander-Effekts"**

Im Gegensatz zu den Reportergenuntersuchungen, bei denen die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen der Zelllinien durch Standardisierung der CAT-Werte mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Test ausgeglichen wurden, wirkt sich die Transfektionseffizienz in den Untersuchungen mit den "Suizidgen"-Plasmiden direkt auf das Ergebnis aus.

Da DT-A nur die transfizierten Zellen tötet, spielt für die Wirkung dieser

Konstrukte die Transfektionseffizienz eine ausschlaggebende Rolle. Das erklärt das nicht nachweisbare Ansprechen der Zelllinien B16 und MeWo, bei denen sogar mit der Positivkontrolle (pCMV/DT-A) keine Abtötung der Zellen nachweisbar ist. Wenn nur die transfizierten Zellen getötet werden (17% bei B16, 3% bei MeWo), ist dieser geringe Effekt vier Tage nach Transfektion (Abb. 3.10), aber auch im zeitlichen Verlauf betrachtet (Abb. 3.13), möglicherweise nicht mehr nachweisbar, da sich die nicht transfizierten Zellen unbeeinträchtigt weiter vermehren. Dieser Effekt kommt vor allem bei sich schnell verdoppelnden Zellen zum Tragen (MeWo, HeLa, B16 und SK-Mel-23, Verdopplungszeit etwa ein Tag), während bei Zellen mit langsamem Wachstum (UKRV-Mel-6a, Verdopplungszeit etwa 2,5 Tage) diese Vermehrung der nicht transfizierten Zellen möglicherweise das Ergebnis nicht so stark beeinflusst.

Zudem ist eine steigende Effektivität in der Menge abgetöteter Zellen mit steigender Transfizierbarkeit der Zelllinien (in Klammern) zu beobachten: HeLa (CMV-Promotorplasmid) (49%) > SK-Mel-23 (31%) > UKRV-Mel-6a (20%) > B16 (17%) > MeWo (3%).

Die Wirkung der TK-Expressionsplasmide wird dagegen anscheinend nicht maßgeblich von der Transfektionseffizienz der einzelnen Zelllinien beeinflusst. So zeigt die relativ gut transfizierbare Zelllinie UKRV-Mel-6a (20% Transfektionseffizienz) vergleichbare Anteile überlebender Zellen nach Transfektion mit den einzelnen Plasmiden und GCV-Behandlung wie die sehr schlecht transfizierbare Zelllinie MeWo (3% Transfektionseffizienz). Dies deutet darauf hin, daß weitere, für die Effektivität wichtigere Faktoren eine Rolle im TK/GCV-System spielen. Einen bedeutenden Faktor könnte der "Bystander-Effekt" darstellen, der in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde, sowie die Verdopplungszeit der Zellen, die neben der Zellgröße die Zelldichte beeinflusst und dadurch zum "Bystander-Effekt" beiträgt, aber auch durch schnelleres oder langsames Weiterwachsen der untransfizierten Zellen das Ergebnis des Anteils abgetöteter Zellen zum Meßzeitpunkt verändert.

Trotz der recht schlechten Transfektionseffizienz von 17% überlebenden nur etwa 40-50% der B16-Zellen die GCV-Behandlung nach Transfektion der TK-Expressionsplasmide mit dem Tyrosinase- oder dem HSVtk-Promotor. Dies spricht für einen starken "Bystander-Effekt" in dieser Zelllinie, der auch von



Bonnekoh et al. (1995) beobachtet wurde, während die Ergebnisse in MeWo, UKRV-Mel-6a und HeLa, die geringere zytotoxische Effekte mit den TK-Expressionsplasmiden nach GCV-Behandlung zeigen (noch etwa 60% überlebende Zellen mit den effektivsten Expressionsplasmiden (z.B. pCMV/TK, pTK/TK)) eher einen schwachen "Bystander-Effekt" vermuten lassen. Allerdings könnte die extrem niedrige Transfektionseffizienz von nur 3% in MeWo trotz eines vorhandenen "Bystander-Effekts" ausschlaggebend für die geringe Wirksamkeit der TK-Expressionsplasmide sein.

Für HeLa wurde von Mesnil et al. (1995) das Fehlen eines "Bystander-Effekts" beschrieben. Dies erklärt auch die eher schwache unspezifische Wirkung der HSVtk-Promotorkonstrukte mit dem TK-Effektorgen in HeLa-Zellen (etwa 70% überlebende Zellen; Abb. 3.12) trotz hoher Transfektionseffizienz (49%) verglichen mit der Wirkung dieser Plasmide in den anderen Zelllinien, während der Effekt der entsprechenden DT-A-Expressionsplasmide (nur etwa 40% überlebende Zellen; Abb. 3.10) im Vergleich zu den anderen Zelllinien stark ausfällt. Aufgrund des nicht vorhandenen "Bystander-Effekts" wirkt sich die unspezifische Aktivität des HSVtk-Promotors im TK/GCV-System nicht so stark aus wie in den anderen Zelllinien mit höherem "Bystander-Effekt". Im DT-A-System zeigt HeLa den höchsten Anteil getöteter Zellen, da hier vermutlich die höchste Transfektionseffizienz von 49% ausschlaggebend ist. Umgekehrt zeigen die TK-Expressionsplasmide in B16 hohe Effektivität (nur etwa 25-30% überlebende Zellen mit den effektivsten Plasmiden; Abb. 3.12) vermutlich durch starken "Bystander-Effekt" und kaum meßbare Effektivität der DT-A-Konstrukte (fast 100% überlebende Zellen) durch schwache Transfektionseffizienz (17%). Diese Vermutung, daß die geringe Effektivität der TK-Expressionsplasmide in MeWo- und HeLa-Zellen mit ihrem schwachen "Bystander-Effekt" zusammenhängt, wird unterstützt durch den Vergleich der GCV-behandelten, pCMV/TK-transfizierten HeLa und MeWo-Zellen mit den Zelllinien UKRV-Mel-6a und SK-Mel-23 im zeitlichen Verlauf (Abb. 3.13). Bei HeLa und MeWo überleben im zeitlichen Verlauf etwa 10 mal mehr Zellen als bei SK-Mel-23 und UKRV-Mel-6a.

#### **4.3.2 Nur die HSVtk-Expressionsplasmide können die Zellzahl nachhaltig reduzieren**

Die in Abb. 3.13 beobachteten Wachstumskurven nach Transfektion der "Suizidgen"-Plasmide mit dem CMV-Promotor zeigen im Gegensatz zu den in den Abb. 3.10 und Abb. 3.12 gezeigten "Momentaufnahmen" der MTT-Tests deutlich den Unterschied in der Wirkung von DT-A und TK. Während bei allen getesteten Zelllinien die Zahl der mit dem TK-Expressionsplasmid transfizierten Zellen nach Gabe von GCV (Tag 3) nahezu konstant bleibt oder sinkt, steigt die Kurve für die DT-A-transfizierten Zellen früher oder später, je nach Ansprechen der Zellen, wieder an. Nur TK zeigt also einen nachhaltigen Effekt in der Reduktion der Tumorzellzahl. Durch die TK-Expressionskonstrukte werden nicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt mehr Zellen abgetötet, sondern es kann im beobachteten Zeitraum von acht Tagen auch keine Vermehrung der verbleibenden Zellen beobachtet werden.

Eine Ursache dafür, daß nicht alle mit dem TK-Expressionsplasmid transfizierten und GCV-behandelten Zellen im Beobachtungszeitraum absterben, selbst wenn die Expression vom CMV-Promotor kontrolliert wird, könnte zum einen eine zu geringe Zelldichte sein, so daß nicht alle untransfizierten Zellen Kontakt zu einer transfizierten Zelle haben und dadurch nicht vom "Bystander-Effekt" erreicht werden. Andererseits könnte eine zu geringe GCV-Konzentration die Ursache sein. Diese könnte die Zellen zwar schädigen und damit ihre Teilung beeinträchtigen, aber noch nicht zum Absterben der Zellen ausreichen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, daß die Replikation und damit auch die folgende Teilung aller Zellen durch GCV-Triphosphat schon gehemmt ist, die Zellen aber noch einige Zeit am Leben bleiben. Die Aussage der Abb. 3.13 dürfte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die potentesten spezifischen TK- und DT-A-Expressionsplasmide übertragbar sein, da sie ähnlich starke Effekte in der Abtötung der Melanomzellen hervorbringen wie die entsprechenden CMV-Promotor-Konstrukte.

### **4.3.3 Tyrosinase- und MIA-Promotorplasmide töten die Melanomzellen mit ähnlicher Effizienz wie die CMV-Promotorplasmide**

Die spezifischen Plasmide pTyr III/DT-A bzw. pTyr IV/TK sowie pMIA III/DT-A bzw. pMIA IV/TK zeigen jeweils die beste Aktivität in den meisten der getesteten Melanomzellen, wobei die Plasmide mit dem Tyrosinasepromotor den MIA-Promotor-Plasmiden in den meisten Zelllinien überlegen sind. Ihre Effektivität entspricht oder übertrifft sogar die der entsprechenden CMV-Promotorplasmide. Ähnlich aktiv in der Abtötung von humanen Melanomzellen wie das CMV-Promotorkonstrukt zeigt sich auch in Untersuchungen von Park et al. (1999) das Expressionsplasmid mit dem humanen Tyrosinasepromotor und zwei murinen Enhancerelementen, wobei allerdings das Purin-Nukleotid-Phosphorylasegen als "Suizidgen" verwendet wurde.

Die Beobachtung, daß die Tyrosinase- und MIA-Promotorplasmide mit der höchsten Aktivität in den Zytotoxizitätstests vergleichbare Effektivität zu den CMV-Promotorplasmiden zeigen (Abb. 3.10 und 3.12), obwohl sie in CAT-Reportergenuntersuchungen (Abb. 3.3 und 3.5) nur maximal 3% der CMV-Promotoraktivität erreichen, könnte darauf zurückzuführen sein, daß sich durch minimale Sequenzveränderungen an den Übergängen zwischen Promotor und kodierender Sequenz oder im 3' untranslatierten Bereich durch die Umklonierungen Veränderungen in der Expressionsstärke ergeben haben. Da es sich um so dramatische Effekte handelt, ist jedoch eher davon auszugehen, daß, in Übereinstimmung mit Yang et al. (1998), die höhere TK-Aktivität in einer Zelle (durch stärkere Expression von TK) keinen großen Einfluß auf den "Bystander-Effekt" hat. Dies würde bedeuten, daß ab einem gewissen "Schwellenwert" die Menge der exprimierten TK kaum Auswirkung auf die Anzahl überlebender Zellen hat, sondern nur die Stärke des "Bystander-Effekts", d.h. die Anzahl der nicht transfizierten Zellen, die in der Umgebung der transfizierten Zelle abgetötet werden.

## **4.4 Schlußfolgerung**

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, daß die Aktivität sowohl des Tyrosinase- als auch des MIA-Promotors durch melanozytenspezifische

Enhancerelemente soweit gesteigert werden kann, daß sie die Expression eines "Suizidgens" mit der gleichen Wirksamkeit wie der CMV-Promotor, aber mit hoher Selektivität in Melanomzellen, kontrollieren. Dabei zeigten die Plasmide mit drei Enhancerelementen im DT-A-System (pTyr III/DT-A, pMIA III/DT-A) und die Plasmide mit vier Enhancerelementen im TK/GCV-System (pTyr IV/TK, pMIA IV/TK) die höchste Wirksamkeit im selektiven Abtöten der Melanomzellen.

Im TK/GCV-System werden mit den vergleichbaren Plasmiden jeweils mehr Zellen abgetötet als im DT-A-System und nur im TK/GCV-System führt die Abtötung der Zellen zu einer nachhaltigen Reduktion der Zellzahl, weshalb es für zukünftige *in vivo* Untersuchungen die höhere Effektivität einer "Suizidgentherapie" verspricht.

#### 4.5 Ausblick

Wie die Ergebnisse der Tests der zelltypspezifischen DT-A und TK-Expressionsplasmide im Vergleich mit den CMV-Promotorplasmiden gezeigt haben, wird es in Zukunft nicht darauf ankommen, die Promotoraktivität weiter zu steigern, sondern die Effizienz der Aufnahme der Konstrukte durch die Zellen (z.B. mit Hilfe effizienterer Transfektionsreagenzien) sowie für die Anwendung der TK-Expressionsplasmide den "Bystander-Effekt" zu erhöhen. Zunächst müssen dazu jedoch der "Bystander-Effekt" und die Möglichkeiten, diesen zu verstärken, durch stabil transfizierte Zelllinien *in vitro* untersucht werden. Park et al. (1997) konnten z.B. durch Retinoide *in vitro* und *in vivo* eine Verstärkung des über "Gap Junctions" vermittelten "Bystander-Effekts" erreichen. Es müßte getestet werden, ob dies auch für die hier untersuchten Melanomzellen zutrifft und somit ein sinnvoller Ansatz zur Steigerung der Effektivität der TK-Expressionsplasmide darstellt, da "Gap Junctions" als ein wahrscheinlicher Vermittler des "Bystander-Effekts" in Tumorzellen oft herunterreguliert sind (Yamasaki, 1990).

Um den Nutzen der hier entwickelten zelltypspezifischen Promotorkonstrukte für die Gentherapie des malignen Melanoms zu verifizieren, müssen *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell durchgeführt werden. Hierbei werden insbesondere der Weg der Applikation und die Wahl des Vektors eine große

Rolle für den Erfolg der Therapie spielen. Eine Bedeutung für die zukünftige Therapie des malignen Melanoms am Menschen wird nur die systemische Applikation haben. Mit intratumoraler Gabe der gentherapeutischen Konstrukte können nie alle eventuell vorhandenen Metastasen im Körper erreicht werden und somit wird diese Form der Applikation höchstens für eine Überprüfung der lokalen Wirksamkeit der Konstrukte im Mausmodell oder zur Reduktion der Tumorlast eine Rolle spielen können.

Das Ziel einer systemischen Applikation der "Suizidgen"-Plasmide birgt aber das Problem des effizienten Transfers der Konstrukte zur Tumorzelle. Die effizientesten Genfähren sind heutzutage immer noch virale Vektoren (zur Übersicht: v. Kalle et al., 1999). Die am häufigsten eingesetzten Viren sind Retroviren und Adenoviren, daneben werden aber unter anderem auch Herpesviren und Adeno-assoziierte Viren für die Gentherapie getestet. Retrovirale Vektoren haben den Vorteil gegenüber adenoviralen Vektoren, daß sie nicht immunogen wirken, dafür aber eine geringe Kapazität für therapeutische Sequenzen haben und nur sich teilende Zellen infizieren. Außerdem besteht die Möglichkeit der homologen Rekombination mit endogenen Retroviren, was zur Entwicklung neuer, replikationsfähiger Viren führen könnte. Der Einsatz von nicht viralen Methoden des Gentransfers, z.B. die Verwendung von Liposomen oder Protein-DNA-Komplexen, vermeidet zwar die potentiellen Risiken und Nachteile von viralen Vektoren, ist aber längst nicht so effizient.

Nach der Entwicklung potenter und spezifischer Konstrukte für die "Suizidgentherapie" des malignen Melanoms *in vitro* wird der Erfolg dieser Konstrukte *in vivo* daher zu einem nicht geringen Teil von der zukünftigen Weiterentwicklung der Transfermethoden hin zu effizienten, risikoarmen Genfähren abhängen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Melanom ist ein aggressiver Tumor der Haut, dessen Inzidenz und Mortalität weltweit ansteigt. Da die klassischen Behandlungsmöglichkeiten wie Chemotherapie und Bestrahlung im metastasierten Stadium der Erkrankung wenig effizient sind, ist die Gentherapie mit Plasmiden zur selektiven und effizienten Abtötung von Melanomzellen ein vielversprechender alternativer Therapieansatz. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Entwicklung solcher Plasmide, wobei die selektive Abtötung durch transkriptionell regulierte Expression zytotoxisch wirkender Genprodukte mit Hilfe von zelltypspezifischen Promotoren und Enhancern gewährleistet werden sollte.

Als zelltypspezifische Promotoren wurden der gut charakterisierte Tyrosinase- und der "Melanoma Inhibitory Activity" (MIA)-Promotor verwendet. Die Aktivität und Zelltypspezifität beider Promotoren wurde zunächst in Reportergenuntersuchungen getestet. Da beide Promotoren sehr schwache Aktivität zeigten, wurden sie mit mehreren Kopien eines pigmentzellspezifischen Enhancerelements aus dem murinen Tyrosinasegen fusioniert und ihre Aktivität dadurch selektiv in Melanomzellen gesteigert. Drei und vier Kopien des Enhancers führten dabei zu maximaler zelltypspezifischer Aktivitätssteigerung der Promotoren. Die Fusion mit mehreren Kopien eines Enhancers aus dem humanen Tyrosinasegen ("Tyrosinase Distal Element", TDE) konnte dagegen keine weitere Aktivitätssteigerung bewirken.

Zur Abtötung der Melanomzellen wurden die A-Kette des bakteriellen Diphtherietoxingens und das Herpes-Simplex-Virus (HSV)-Thymidinkinasegen als "Suizidgene" unter der Kontrolle des Tyrosinase- und des MIA-Promotors mit drei und vier Kopien des murinen pigmentzellspezifischen Enhancerelements exprimiert. Diese Expression der "Suizidgene" führte zu einer selektiven Abtötung der Melanomzellen gegenüber der Kontrollzelllinie.

Die höchste spezifische Effizienz in der Abtötung der Melanomzellen wurde bei Expression der HSV-Thymidinkinase durch die Promotoren mit vier murinen Enhancern, bei Expression des Diphtherietoxins durch die Promotoren mit drei murinen Enhancerelementen erreicht. Dabei zeigten diese Plasmide

vergleichbare Effektivität Melanomzellen abzutöten wie das Vergleichsplasmid mit dem starken viralen CMV (Cytomegalo-Virus)-Promotor, aber eine selektive Aktivität in Melanomzellen. Während die Diphtherietoxin-Expressionsplasmide die Tumorzellzahl gegenüber der Negativkontrolle zwar reduzieren können und einen verzögerten Anstieg der Wachstumskurve bewirken, führt nur die HSV-Thymidinkinase zur effektiven Reduktion der Zellzahl über den gesamten Beobachtungszeitraum von acht Tagen.

Die in dieser Arbeit entwickelten, selektiv in Melanomzellen aktiven Expressionsplasmide bieten eine gute Grundlage für weitere Optimierung auf dem Weg zur Gentherapie des malignen Melanoms.

## 6 ABKÜRZUNGEN

|               |  |
|---------------|--|
| A             | Adenin   |
| A.b.          | Aqua bidest  |
| ADP           | Adenosindiphosphat   |
| Amp.          | Ampicillin   |
| ATP           | Adenosintriphosphat  |
| bp            | Basenpaare   |
| BSA           | "Bovine Serum Albumin" (Rinderserumalbumin)                      |
| C             | Cytosin  |
| CAT           | Chloramphenicol-Acetyltransferase                                |
| C-Domäne      | katalytische Domäne  |
| CEA           | "Carcinoembryonic Antigen"                                       |
| Ci            | Curie  |
| cm            | Zentimeter   |
| CMDA          | 4-((2-Chloroethyl)(2-mesyloxyethyl)Amino)Benzoyl-L-Glutaminsäure |
| CMV           | Cytomegalievirus   |
| CP            | Cyclophosphamide   |
| CTP           | Cytidintriphosphat   |
| dATP          | Desoxyadenosintriphosphat  |
| dCTP          | Desoxycytidintriphosphat   |
| dGTP          | Desoxyguanosintriphosphat  |
| DMPC          | Dimethylpyrocarbonat   |
| DMSO          | Dimetylsulfoxid  |
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNase         | Desoxyribonuklease   |
| dNTP          | Desoxynukleosidtriphosphat                                       |
| DT-A          | A-Kette des Diphtherietoxins                                     |
| DTT           | 1.4-Dithiothreitol   |
| dTTP          | Desoxythymidintriphosphat  |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure                                     |
| EF-2          | Elongationsfaktor 2  |
| ELISA         | "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"                              |
| Enh.          | Enhancer   |
| et al.        | "et aliter" (und andere)   |
| EtOH          | Ethanol  |
| FACS          | "Fluorescence-Activated Cellsorter"                              |
| 5-FC          | 5-Fluorocytosin  |
| FCS           | fötales Kälberserum  |
| 5-FU          | 5-Fluorouracil   |
| G             | Guanin   |
| g             | Gramm  |



---

|           |   |
|-----------|---|
| GAPDH     | Glycerin-Aldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase   |
| GCV       | Ganciclovir   |
| GFP       | "Green Fluorescent Protein"   |
| ggf.      | gegebenenfalls  |
| HB-EGF    | Heparin bindender "EGF-Like Growth Faktor"  |
| HCR       | "Highly Conserved Region"   |
| HSV       | Herpes-Simplex-Virus  |
| IAA       | Indol-3-Essigsäure ("Indole-3-Acetic Acid")   |
| kb        | Kilobasen   |
| kDa       | Kilodalton  |
| l         | Liter   |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium:   |
| M         | molar   |
| mA        | Milliampere   |
| MATF      | "Melanoma-associated Transcription Factor"  |
| mg        | Milligramm  |
| MIA       | "Melanoma Inhibitory Activity"  |
| MITF      | "Microphthalmia Associated Transcription Faktor"                                      |
| ml        | Milliliter  |
| mM        | millimolar  |
| mmol      | Millimol  |
| MOPS      | 3-(N-morpholino)-2-hydroxypropansulfonat  |
| 6-MPDR    | 6-Methylpurin-2'-Deoxyribonukleosid   |
| mRNA      | "messenger" RNA   |
| MTT       | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenoltetrazolium-Bromid                            |
| mV        | Millivolt   |
| µg        | Mikrogramm  |
| µl        | Mikroliter  |
| µm        | Mikrometer  |
| µM        | Mikromolar  |
| NaAcetat  | Natriumacetat   |
| ng        | Nanogramm   |
| OD        | optische Dichte   |
| ONPG      | O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid  |
| P         | Phosphat  |
| PBS       | "Phosphate-Buffered Saline" (phosphatgepufferte Salzlösung)                           |
| PCI       | Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch  |
| PCR       | Polymerase Kettenreaktion   |
| pH        | Wasserstoffexponent (neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration) |
| Prom.     | Promotor  |
| PSA       | "Prostata-Specific Antigen"   |
| R-Domäne  | Rezeptorbindungsdomäne  |
| RNA       | Ribonukleinsäure  |

---

|          |   |
|----------|---|
| RNase    | Ribonuklease                                      |
| rRNA     | ribosomale RNA                                    |
| S        | Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)      |
| SAP      | Alkalische Phosphatase aus Shrimps                |
| SDS      | Sodium-dodecylsulfat                              |
| SeMET    | Selenomethionin                                   |
| SSC      | "Standard Saline-Citrat"-Puffer                   |
| SV40     | Simian Virus 40                                   |
| T        | Thymidin  |
| TBE      | Tris-Borat-EDTA-Puffer                            |
| TDE      | "Tyrosinase Distal Element"                       |
| T-Domäne | Transmembrandomäne                                |
| TIL      | Tumor-infiltrierende Lymphozyten                  |
| TK, tk   | Thymidinkinase                                    |
| TNF      | Tumor-Nekrosefaktor                               |
| TPE      | "Tyrosinase Proximal Element"                     |
| TRP      | "Tyrosinase Related Protein"                      |
| Tyr      | Tyrosinase  |
| U        | "Unit" (Einheit der Enzymaktivität)               |
| u.a.     | unter anderem                                     |
| UpM      | Umdrehungen pro Minute                            |
| UV       | ultraviolett                                      |
| V        | Volt  |
| vgl.     | vergleiche  |
| v/v      | "volume per volume"                               |
| w/v      | "weight per volume"                               |
| X-Gal    | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid |
| z.B.     | zum Beispiel                                      |

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmann, D. L., Creagan, E. T., Hahn, R. G., Edmonson, J. H., Bisel, H. F. & Schaid, D. J. (1989). Complete responses and long-term survivals after systemic chemotherapy for patients with advanced malignant melanoma. *Cancer* **63**, 224-7.
- Alvarez, R. D., Barnes, M. N., Gomez Navarro, J., Wang, M., Strong, T. V., Arafat, W., Arani, R. B., Johnson, M. R., Roberts, B. L., Siegal, G. P. & Curiel, D. T. (2000). A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* **6**, 3081-7.
- Anderson, W. (1998). Human gene therapy. *Nature* **392** (suppl.), 25-30.
- Antoine, F. S. (1990). Human gene therapy trial in cancer patients about to begin. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1877-8.
- Artuc, M., Nurnberg, W., Czarnetzki, B. M. & Schadendorf, D. (1995). Characterization of gene regulatory elements for selective gene expression in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **213**, 699-705.
- Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E., Bosch, F. X., Muller, G., Ruther, U. & Schutz, G. (1990). Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. *Embo J* **9**, 2819-26.
- Bentley, N. J., Eisen, T. & Goding, C. R. (1994). Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol* **14**, 7996-8006.
- Berenstein, M., Adris, S., Ledda, F., Wolfmann, C., Medina, J., Bravo, A., Mordoh, J., Chernajovsky, Y. & Podhajcer, O. L. (1999). Different efficacy of in vivo herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction and ganciclovir treatment on the inhibition of tumor growth of murine and human melanoma cells and rat glioblastoma cells. *Cancer Gene Ther* **6**, 358-66.
- Bergmann, L. (1989). Malignant melanoma--prognosis and actual treatment strategies with chemotherapy and biological response modifiers. *Eur J Cancer Clin Oncol* **25 Suppl 3**, S31-6.
- Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J. P. & Ballotti, R. (1996). Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol* **134**, 747-55.
- Bi, W. L., Parysek, L. M., Warnick, R. & Stambrook, P. J. (1993). In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* **4**, 725-31.
- Blesch, A., Bosserhoff, A. K., Apfel, R., Behl, C., Hessdoerfer, B., Schmitt, A., Jachimczak, P., Lottspeich, F., Buettner, R. & Bogdahn, U. (1994). Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res* **54**, 5695-701.
- Bogdahn, U., Apfel, R., Hahn, M., Gerlach, M., Behl, C., Hoppe, J. & Martin, R. (1989). Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res* **49**, 5358-63.
- Bonnekoh, B., Greenhalgh, D. A., Bundman, D. S., Eckhardt, J. N., Longley, M. A., Chen, S. H., Woo, S. L. & Roop, D. R. (1995). Inhibition of melanoma growth by adenoviral-mediated HSV thymidine kinase gene transfer in vivo. *J Invest Dermatol* **104**, 313-7.
- Bosserhoff, A. K., Echtenacher, B., Hein, R. & Buettner, R. (2001). Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res* **11**, 417-21.
- Bosserhoff, A. K., Golob, M., Buettner, R., Landthaler, M. & Hein, R. (1998). [MIA ("melanoma inhibitory activity"). Biological functions and clinical relevance in malignant melanoma]. *Hautarzt* **49**, 762-9.

- Bosserhoff, A. K., Hein, R., Bogdahn, U. & Buettner, R. (1996). Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem* **271**, 490-5.
- Bosserhoff, A. K., Kaufmann, M., Kaluza, B., Bartke, I., Zirngibl, H., Hein, R., Stolz, W. & Buettner, R. (1997a). Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* **57**, 3149-53.
- Bosserhoff, A. K., Kondo, S., Moser, M., Dietz, U. H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Buettner, R. & Sandell, L. J. (1997b). Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev Dyn* **208**, 516-25.
- Bosserhoff, A. K., Moser, M., Hein, R., Landthaler, M. & Buettner, R. (1999). In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol* **187**, 446-54.
- Calvez, V., Rixe, O., Wang, P., Mouawad, R., Soubrane, C., Ghoumari, A., Verola, O., Khayat, D. & Colbere Garapin, F. (1996). Virus-free transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment induces tumor cell death. *Clin Cancer Res* **2**, 47-51.
- Chargaff, E. (1955). Isolation and Composition of the Deoxypentose Nucleic Acids and of the Corresponding Nuclear Proteins. In *The Nucleic Acids*, vol. 1, pp. 307-407. New York: Academic Press.
- Chen, C. Y., Chang, Y. N., Ryan, P., Linscott, M., McGarrity, G. J. & Chiang, Y. L. (1995). Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir-mediated cytotoxicity and the "bystander effect". *Hum Gene Ther* **6**, 1467-76.
- Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J. & Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **357**, 216-22.
- Collier, R. J. (1975). Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* **39**, 54-85.
- Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. & Blaese, R. M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256**, 1550-2.
- Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**, 23-8.
- Deichmann, M., Benner, A., Bock, M., Jackel, A., Uhl, K., Waldmann, V. & Naher, H. (1999). S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive. *J Clin Oncol* **17**, 1891-6.
- Diaz, R. M., Eisen, T., Hart, I. R. & Vile, R. G. (1998). Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma. *J Virol* **72**, 789-95.
- Djukanovic, D., Hofmann, U., Sucker, A., Rittgen, W. & Schadendorf, D. (2000). Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res* **20**, 2203-7.
- Eisenberg, S. P., Coen, D. M. & McKnight, S. L. (1985). Promoter domains required for expression of plasmid-borne copies of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in virus-infected mouse fibroblasts and microinjected frog oocytes. *Mol Cell Biol* **5**, 1940-7.
- ElKareh, A., Murphy, A. J., Fichter, T., Efstratiadis, A. & Silverstein, S. (1985). "Transactivation" control signals in the promoter of the herpesvirus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1002-6.
- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. & Tsurugi, K. (1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* **262**, 5908-12.
- Falnes, P. O. & Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 407-13.

- Fitzgerald, D. (1996). Why toxins! *Semin Cancer Biol* **7**, 87-95.
- Franke, W., Neumann, N. J., Ruzicka, T. & Schulte, K. W. (2001). [Adjuvant therapy of malignant melanoma]. *Schweiz Rundsch Med Prax* **90**, 301-6.
- Freeman, S. M., Abboud, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L. & Abraham, G. N. (1993). The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* **53**, 5274-83.
- Freeman, S. M., Ramesh, R., Shastri, M., Munshi, A., Jensen, A. K. & Marrogi, A. J. (1995). The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells. *Cancer Lett* **92**, 167-74.
- Ganss, R., Montoliu, L., Monaghan, A. P. & Schutz, G. (1994a). A cell-specific enhancer far upstream of the mouse tyrosinase gene confers high level and copy number-related expression in transgenic mice. *Embo J* **13**, 3083-93.
- Ganss, R., Schutz, G. & Beermann, F. (1994b). The mouse tyrosinase gene. Promoter modulation by positive and negative regulatory elements. *J Biol Chem* **269**, 29808-16.
- Gershon, D. (1991). Gene therapy. Cancer trial starts. *Nature* **349**, 445.
- Goldberg, G. & Bertram, J. S. (1994). Re: Z. Ram et al., In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.*, 53:83-88, 1993. *Cancer Res* **54**, 3947-8.
- Golob, M., Buettner, R. & Bosserhoff, A. K. (2000). Characterization of a transcription factor binding site, specifically activating MIA transcription in melanoma. *J Invest Dermatol* **115**, 42-7.
- Greco, O. & Dachs, G. U. (2001). Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol* **187**, 22-36.
- Greenfield, L., Bjorn, M. J., Horn, G., Fong, D., Buck, G. A., Collier, R. J. & Kaplan, D. A. (1983). Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6853-7.
- Guba, M., Bosserhoff, A. K., Steinbauer, M., Abels, C., Anthuber, M., Buettner, R. & Jauch, K. W. (2000). Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer* **83**, 1216-22.
- Hasenburger, A., Tong, X. W., Rojas Martinez, A., Nyberg Hoffman, C., Kieback, C. C., Kaplan, A., Kaufman, R. H., Ramzy, I., Aguilar Cordova, E. & Kieback, D. G. (2000). Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* **7**, 839-44.
- Hearing, V. J. & Jimenez, M. (1989). Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res* **2**, 75-85.
- Herman, J. R., Adler, H. L., Aguilar Cordova, E., Rojas Martinez, A., Woo, S., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C. & Scardino, P. T. (1999). In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* **10**, 1239-49.
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* **74**, 395-404.
- Honess, R. W. & Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**, 8-19.
- Honess, R. W. & Roizman, B. (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1276-80.
- Jackson, I. J., Chambers, D. M., Budd, P. S. & Johnson, R. (1991). The tyrosinase-related protein-1 gene has a structure and promoter sequence very different from tyrosinase. *Nucleic Acids Res* **19**, 3799-804.

- Johnson, T. M., Smith, J. W., 2nd, Nelson, B. R. & Chang, A. (1995). Current therapy for cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* **32**, 689-707; quiz 708-9.
- Jones, N. C., Rigby, P. W. & Ziff, E. B. (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev* **2**, 267-81.
- Juergensen, A., Holzapfel, U., Hein, R., Stolz, W., Buettner, R. & Bosserhoff, A. (2000). Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. *Tumour Biol* **22**, 54-8.
- Kadesch, T. (1993). Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ* **4**, 49-55.
- Kamanabrou, D. (2001). [Treatment of metastasized malignant melanoma]. *Schweiz Rundsch Med Prax* **90**, 391-6.
- Klatzmann, D., Cherin, P., Bensimon, G., Boyer, O., Coutellier, A., Charlotte, F., Boccaccio, C., Salzmann, J. L. & Herson, S. (1998). A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma. *Hum Gene Ther* **9**, 2585-94.
- Kluppel, M., Beermann, F., Ruppert, S., Schmid, E., Hummler, E. & Schutz, G. (1991). The mouse tyrosinase promoter is sufficient for expression in melanocytes and in the pigmented epithelium of the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3777-81.
- Kohno, K., Uchida, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Nakanishi, T., Fukui, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. & Okada, Y. (1986). Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: homology with GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4978-82.
- Kumagai, T., Tanio, Y., Osaki, T., Hosoe, S., Tachibana, I., Ueno, K., Kijima, T., Horai, T. & Kishimoto, T. (1996). Eradication of Myc-overexpressing small cell lung cancer cells transfected with herpes simplex virus thymidine kinase gene containing Myc-Max response elements. *Cancer Res* **56**, 354-8.
- Kunitomi, M., Takayama, E., Suzuki, S., Yasuda, T., Tsutsui, K., Nagaike, K., Hiroi, S. & Tadakuma, T. (2000). Selective inhibition of hepatoma cells using diphtheria toxin A under the control of the promoter/enhancer region of the human alpha-fetoprotein gene. *Jpn J Cancer Res* **91**, 343-50.
- Kwon, B. S., Haq, A. K., Wakulchik, M., Kestler, D., Barton, D. E., Francke, U., Lamoreux, M. L., Whitney, J. B., 3rd & Halaban, R. (1989). Isolation, chromosomal mapping, and expression of the mouse tyrosinase gene. *J Invest Dermatol* **93**, 589-94.
- Kwon, H. J., Yim, S. W., Lee, D. H. & Jang, K. L. (1999). Activation of the thymidine kinase promoter by herpes simplex virus type 1 immediate early proteins. *Mol Cells* **9**, 277-80.
- Lowings, P., Yavuzer, U. & Goding, C. R. (1992). Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol Cell Biol* **12**, 3653-62.
- Luckow, B. & Schutz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **15**, 5490.
- Makinen, K., Loimas, S., Wahlfors, J., Alhava, E. & Janne, J. (2000). Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer. *J Gene Med* **2**, 361-7.
- Manome, Y., Abe, M., Hagen, M. F., Fine, H. A. & Kufe, D. W. (1994). Enhancer sequences of the DF3 gene regulate expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and confer sensitivity of human breast cancer cells to ganciclovir. *Cancer Res* **54**, 5408-13.
- Maxwell, I. H., Maxwell, F. & Glode, L. M. (1986). Regulated expression of a diphtheria toxin A-chain gene transfected into human cells: possible strategy for inducing cancer cell suicide. *Cancer Res* **46**, 4660-4.

- McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. C., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E. & Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **69**, 1531-74.
- McGeoch, D. J., Dolan, A., Donald, S. & Brauer, D. H. (1986). Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res* **14**, 1727-45.
- McKnight, S. & Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* **46**, 795-805.
- McKnight, S. L., Gavis, E. R., Kingsbury, R. & Axel, R. (1981). Analysis of transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: identification of an upstream control region. *Cell* **25**, 385-98.
- Mesnil, M., Krutovskikh, V., Piccoli, C., Elfgang, C., Traub, O., Willecke, K. & Yamasaki, H. (1995). Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res* **55**, 629-39.
- Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K. & Yamasaki, H. (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1831-5.
- Middlebrook, J. L. & Dorland, R. B. (1977). Response of cultured mammalian cells to the exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium diphtheriae*: differential cytotoxicity. *Can J Microbiol* **23**, 183-9.
- Middlebrook, J. L. & Dorland, R. B. (1984). Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol Rev* **48**, 199-221.
- Miki, K., Xu, M., Gupta, A., Ba, Y., Tan, Y., Al Refaie, W., Bouvet, M., Makuuchi, M., Moossa, A. R. & Hoffman, R. M. (2001). Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide prodrug substrate. *Cancer Res* **61**, 6805-10.
- Moehring, T. J., Danley, D. E. & Moehring, J. M. (1984). In vitro biosynthesis of diphthamide, studied with mutant Chinese hamster ovary cells resistant to diphtheria toxin. *Mol Cell Biol* **4**, 642-50.
- Moolten, F. L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* **46**, 5276-81.
- Morris, J. C., Ramsey, W. J., Wildner, O., Muslow, H. A., Aguilar Cordova, E. & Blaese, R. M. (2000). A phase I study of intralesional administration of an adenovirus vector expressing the HSV-1 thymidine kinase gene (AdV.RSV-TK) in combination with escalating doses of ganciclovir in patients with cutaneous metastatic malignant melanoma. *Hum Gene Ther* **11**, 487-503.
- Muller, G., Ruppert, S., Schmid, E. & Schutz, G. (1988). Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *Embo J* **7**, 2723-30.
- Murayama, Y., Tadakuma, T., Kunitomi, M., Kumai, K., Tsutsui, K., Yasuda, T. & Kitajima, M. (1999). Cell-specific expression of the diphtheria toxin A-chain coding sequence under the control of the upstream region of the human alpha-fetoprotein gene. *J Surg Oncol* **70**, 145-9.
- Naeyaert, J. M., Eller, M., Gordon, P. R., Park, H. Y. & Gilchrest, B. A. (1991). Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br J Dermatol* **125**, 297-303.
- Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W. & Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* **69**, 1051-61.
- Nagy, H. J., Panis, Y., Fabre, M., Klatzmann, D., Houssin, D. & Soubrane, O. (2000). Suicide gene therapy of ovarian cancer: an experimental study in rats using retroviral-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Anticancer Res* **20**, 4633-8.

- Osaki, T., Tanio, Y., Tachibana, I., Hosoe, S., Kumagai, T., Kawase, I., Oikawa, S. & Kishimoto, T. (1994). Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Res* **54**, 5258-61.
- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H. & Brinster, R. L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* **50**, 435-43.
- Pang, S. (2000). Targeting and eradicating cancer cells by a prostate-specific vector carrying the diphtheria toxin A gene. *Cancer Gene Ther* **7**, 991-6.
- Pappenheimer, A. M., Jr. (1977). Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* **46**, 69-94.
- Park, B. J., Brown, C. K., Hu, Y., Alexander, H. R., Horti, J., Raje, S., Figg, W. D. & Bartlett, D. L. (1999). Augmentation of melanoma-specific gene expression using a tandem melanocyte-specific enhancer results in increased cytotoxicity of the purine nucleoside phosphorylase gene in melanoma. *Hum Gene Ther* **10**, 889-98.
- Park, J. Y., Elshami, A. A., Amin, K., Rizk, N., Kaiser, L. R. & Albelda, S. M. (1997). Retinoids augment the bystander effect in vitro and in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy. *Gene Ther* **4**, 909-17.
- Parker, W. B., King, S. A., Allan, P. W., Bennett, L. L., Jr., Secrist, J. A., 3rd, Montgomery, J. A., Gilbert, K. S., Waud, W. R., Wells, A. H., Gillespie, G. Y. & Sorscher, E. J. (1997). In vivo gene therapy of cancer with E. coli purine nucleosidephosphorylase. *Hum Gene Ther* **8**, 1637-44.
- Perez, R. P., Zhang, P., Bosserhoff, A. K., Buettner, R. & Abu Hadid, M. (2000). Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Hum Pathol* **31**, 1381-8.
- Princen, F., Robe, P., Lechanteur, C., Mesnil, M., Rigo, J. M., Gielen, J., Merville, M. P. & Bours, V. (1999). A cell type-specific and gap junction-independent mechanism for the herpes simplex virus-1 thymidine kinase gene/ganciclovir-mediated bystander effect. *Clin Cancer Res* **5**, 3639-44.
- Ram, Z., Walbridge, S., Shawker, T., Culver, K. W., Blaese, R. M. & Oldfield, E. H. (1994). The effect of thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor vasculature and growth of 9L gliomas in rats. *J Neurosurg* **81**, 256-60.
- Ramesh, R., Marrogi, A. J., Munshi, A., Abboud, C. N. & Freeman, S. M. (1996). In vivo analysis of the 'bystander effect': a cytokine cascade. *Exp Hematol* **24**, 829-38.
- Reid, R., Mar, E. C., Huang, E. S. & Topal, M. D. (1988). Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human alpha and human beta polymerases. A unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate. *J Biol Chem* **263**, 3898-904.
- Richards, C. A., Wolberg, A. S. & Huber, B. E. (1993). The transcriptional control region of the human carcinoembryonic antigen gene: DNA sequence and homology studies. *DNA Seq* **4**, 185-96.
- Rochlitz, C. F. (2001). Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly* **131**, 4-9.
- Roth, J. A. & Cristiano, R. J. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* **89**, 21-39.
- Roth, J. A., Nguyen, D., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., Ferson, D. Z., Hong, W. K., Komaki, R., Lee, J. J., Nesbitt, J. C., Pisters, K. M., Putnam, J. B., Schea, R., Shin, D. M., Walsh, G. L., Dolormente, M. M., Han, C. I., Martin, F. D., Yen, N., Xu, K., Stephens, L. C., McDonnell, T. J., Mukhopadhyay, T. & Cai, D. (1996). Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* **2**, 985-91.
- Ruppert, S., Muller, G., Kwon, B. & Schutz, G. (1988). Multiple transcripts of the mouse tyrosinase gene are generated by alternative splicing. *Embo J* **7**, 2715-22.



- Schmitt, C. K., Meysick, K. C. & AD, O. B. (1999). Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis* **5**, 224-34.
- Shalev, M., Kadmon, D., Teh, B. S., Butler, E. B., Aguilar Cordova, E., Thompson, T. C., Herman, J. R., Adler, H. L., Scardino, P. T. & Miles, B. J. (2000). Suicide gene therapy toxicity after multiple and repeat injections in patients with localized prostate cancer. *J Urol* **163**, 1747-50.
- Shibahara, S., Okinaga, S., Tomita, Y., Takeda, A., Yamamoto, H., Sato, M. & Takeuchi, T. (1990). A point mutation in the tyrosinase gene of BALB/c albino mouse causing the cysteine----serine substitution at position 85. *Eur J Biochem* **189**, 455-61.
- Shibahara, S., Taguchi, H., Muller, R. M., Shibata, K., Cohen, T., Tomita, Y. & Tagami, H. (1991). Structural organization of the pigment cell-specific gene located at the brown locus in mouse. Its promoter activity and alternatively spliced transcript. *J Biol Chem* **266**, 15895-901.
- Shibata, K., Muraosa, Y., Tomita, Y., Tagami, H. & Shibahara, S. (1992). Identification of a cis-acting element that enhances the pigment cell-specific expression of the human tyrosinase gene. *J Biol Chem* **267**, 20584-8.
- Siders, W. M., Halloran, P. J. & Fenton, R. G. (1996). Transcriptional targeting of recombinant adenoviruses to human and murine melanoma cells. *Cancer Res* **56**, 5638-46.
- Siders, W. M., Halloran, P. J. & Fenton, R. G. (1998). Melanoma-specific cytotoxicity induced by a tyrosinase promoter-enhancer/herpes simplex virus thymidine kinase adenovirus. *Cancer Gene Ther* **5**, 281-91.
- Silvers, W. (1979). The Coat Colors of Mice - A Model for Mammalian Gene Action and Interaction (ed. Springer). New York.
- Simpson, I., Rose, B. & Loewenstein, W. R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* **195**, 294-6.
- Simpson, J. C., Smith, D. C., Roberts, L. M. & Lord, J. M. (1998). Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp Cell Res* **239**, 293-300.
- Springer, C. J. & Niculescu Duvaz, I. (2000). Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest* **105**, 1161-7.
- St Clair, M. H., Lambe, C. U. & Furman, P. A. (1987). Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 844-9.
- Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Bruggert, M., Ambrosius, D., Palme, S., Engh, R. A., Golob, M., Breibach, I., Buettner, R., Voelter, W., Holak, T. A. & Bosserhoff, A. K. (2001). The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *Embo J* **20**, 340-9.
- Tachibana, M., Perez Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U. & Arnheiter, H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Hum Mol Genet* **3**, 553-7.
- Tanaka, S., Yamamoto, H., Takeuchi, S. & Takeuchi, T. (1990). Melanization in albino mice transformed by introducing cloned mouse tyrosinase gene. *Development* **108**, 223-7.
- v. Kalle, C., Veelken, H. & Rosenthal, F. (1999). Gentherapie in der Onkologie. *Onkologe* **5**, 898-909.
- van Groningen, J. J., Bloemers, H. P. & Swart, G. W. (1995). Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. *Cancer Res* **55**, 6237-43.
- Vile, R. G. & Hart, I. R. (1993). Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer Res* **53**, 3860-4.

- Vrionis, F. D., Wu, J. K., Qi, P., Waltzman, M., Cherington, V. & Spray, D. C. (1997). The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions. *Gene Ther* **4**, 577-85.
- Wei, S. J., Chao, Y., Hung, Y. M., Lin, W. C., Yang, D. M., Shih, Y. L., Ch'ang, L. Y., Whang Peng, J. & Yang, W. K. (1998). S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp Cell Res* **241**, 66-75.
- Xie, W. F., Zhang, X., Sakano, S., Lefebvre, V. & Sandell, L. J. (1999). Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J Bone Miner Res* **14**, 757-63.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. & Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**, 245-50.
- Yamasaki, H. (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1051-8.
- Yang, L., Chiang, Y., Lenz, H. J., Danenberg, K. D., Spears, C. P., Gordon, E. M., Anderson, W. F. & Parekh, D. (1998). Intercellular communication mediates the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells. *Hum Gene Ther* **9**, 719-28.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y. & Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* **14**, 8058-70.
- Yavuzer, U. & Goding, C. R. (1994). Melanocyte-specific gene expression: role of repression and identification of a melanocyte-specific factor, MSF. *Mol Cell Biol* **14**, 3494-503.
- Yokoyama, K., Yasumoto, K., Suzuki, H. & Shibahara, S. (1994). Cloning of the human DOPachrome tautomerase/tyrosinase-related protein 2 gene and identification of two regulatory regions required for its pigment cell-specific expression. *J Biol Chem* **269**, 27080-7.

## **8 ANHANG**

### **8.1 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Aurich, Beato, Berndt, Elsässer, Feuser, Fruhstorfer, Funk; Garten, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hartmann, Jenc, Jungclas, Kern, Kirchner, Knöller, Koch, Koolman, Lammel, Lang, Lefkovits, Löffler, Lührmann, Mandrek, McGregor, Melsheimer, Müller, Niessing, Rausch, Risau, Rogausch, Röhm, Schachtschabel, Schäfer, Schrimpf, Schulz, Schwee, Sedlacek, Seifart, Seitz, Seitz, Steininger, Steinmetz, Suske, Voigt, von Löw, Waßmuth, Westermann, Westphal.

Meine akademischen Lehrer in Heidelberg/Mannheim waren die Herren:

Schadendorf, Schütz.

## 8.2 Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. Rudolf Happel, der mir als Betreuer und Gutachter erst die Möglichkeit zur Durchführung dieser externen Arbeit gegeben hat.

Genauso danke ich Prof. Dr. Dirk Schadendorf für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt Dr. Annette Paschen für ihre hervorragende fachliche Unterstützung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die wunderbare Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Besonders Antje Sucker und Sandra Christmann standen mir bei der experimentellen Durchführung oft mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank!

Bei Dr. Wolfgang Meißner möchte ich mich dafür bedanken, daß er mir während meiner Diplomarbeit neben viel fachlichem Wissen auch großen Spaß an der Molekularbiologie vermittelt hat und mir auch bei Problemen im Verlauf dieser Arbeit mit konstruktiven Ideen weiterhelfen konnte.

Ein ganz besonders großes Dankeschön gilt meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung sowie meinem Freund Lars für sein Verständnis und das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit.